UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1974 - N° 103

PRODUCTION PAR DIGESTION PAPAINIQUE D'UNE PEPTONE BACTERIOLOGIQUE A PARTIR DE RESIDUS INDUSTRIELS DE PLACENTAS HUMAINS

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche

des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 1er Juillet 1974
pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Yves BOUCAUD-MAITRE

né le 8 Juin 1947

à LYON 4e

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544715_0016

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1974 - N° 103

PRODUCTION PAR DIGESTION PAPAINIQUE D'UNE PEPTONE BACTERIOLOGIQUE A PARTIR DE RESIDUS INDUSTRIELS DE PLACENTAS HUMAINS

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche

des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 1er Juillet 1974
pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Yves BOUCAUD-MAITRE

né le 8 Juin 1947

à LYON 4e

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

U N I V E R S I T E C L A U D E - B E R N A R D

. Président de l'Université : J. BOIDIN
. Premier Vice-Président : R. TOURAINE

. Secrétaire Général : M. J. RAMBAUD

--- oOo ---

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE L'UNIVERSITE

MEDECINE.
- GRANGE-BLANCHE . Directeur : Monsieur le Professeur D. GERMAIN
- ALEXIS-CARREL . Directeur : Monsieur le Professeur C. GIROD
- SUD-OUEST . Directeur : Monsieur le Professeur J. ROBERT
- LYON-NORD . Directeur : Monsieur le Professeur J.P.GARIN

BIOLOGIE HUMAINE .
Directeur : Monsieur le Professeur Jean-Claude CZYBA

TECHNIQUES DE READAPTATION .
Directeur : Monsieur Alain MORGON, Maître de Conférences

SCIENCES PHARMACEUTIQUES .
Directeur : Monsieur le Professeur Maurice CARRAZ

SCIENCES ODONTOLOGIQUES .
Directeur : Monsieur le Docteur Roger VINCENT

INSTITUT REGIONAL D'EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE .
Directeur : Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

MATHEMATIQUES .
Directeur : Monsieur le Professeur Guy MAURY

PHYSIQUE .
Directeur : Monsieur le Professeur Robert UZAN

CHIMIE ET BIOCHIMIE .
Directeur : Monsieur le Professeur Jean HUET

SCIENCES DE LA NATURE .
Directeur : Monsieur le Professeur Jean BRUN

SCIENCES PHYSIOLOGIQUES .
Directeur : Monsieur Robert FONTANGES, Maître de Conférences

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N° 1 .
Directeur : Monsieur le Professeur Bernard POUYET

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N° 2 .
Directeur : Monsieur Jean GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE .
Directeur : Monsieur le Professeur Joseph-Henry BIGAY

PHYSIQUE NUCLEAIRE .
Directeur : Monsieur le Professeur Armand SARAZIN

MECANIQUE .
Directeur : Monsieur le Professeur Jean MATHIEU

TRAVAIL DU DEPARTEMENT DE

MICROBIOLOGIE,
IMMUNOLOGIE,
EPIDEMIOLOGIE
et HYGIENE DES COLLECTIVITES,

de l'UNITE d'ENSEIGNEMENT et de RECHERCHE des
" *SCIENCES PHARMACEUTIQUES* " de Lyon

Professeur Maurice CARRAZ

Professeur Jean TERRAILLON

TRAVAIL DU DEPARTEMENT

d'IMMUNOLOGIE de L'INSTITUT PASTEUR de LYON et du SUD-EST

Professeur Maurice CARRAZ

Madame Colette VEYSSEYRE

A LA MEMOIRE DE MON GRAND-PERE

A MES PARENTS

Pour Agnès

avec toute ma tendresse

A Monsieur le Professeur Maurice CARRAZ,

notre Maître et Président de Thèse

Il nous a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire, nous a suggéré l'idée de cette thèse et a su nous guider dans nos recherches tout en nous permettant de les poursuivre en toute liberté.

Sa grande compétence, son intelligence brillante et son enthousiasme font notre admiration et resteront pour nous un exemple.

Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

A Monsieur le Professeur Louis REVOL,

Nous conservons un vif souvenir de son enseignement tout au long de nos études pharmaceutiques.

Il nous a accueilli avec amabilité et nous a fait bénéficier de ses connaissances et de sa grande expérience.

Nous sommes très sensibles à l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger notre travail.

A Monsieur le Professeur GRAS,

Nous le remercions sincèrement pour l'aide qu'il nous a apportée dans la réalisation et la rédaction de ce travail. Les remarques qu'il a pu nous faire nous ont été très utiles et nous ont permis de clarifier considérablement notre étude.

Nous lui sommes très reconnaissant d'avoir bien voulu faire partie de notre jury de thèse.

A Madame Colette VEYSSEYRE,

Chef de service adjoint du Laboratoire d'Immunologie,

dont la compétence et la gentillesse nous
furent extrêmement précieuses au cours de
ces trois années, et qui contribua efficacement
à la réalisation de ce travail.

Qu'elle veuille accepter nos sincères remerciements
et l'expression de notre sympathie.

A tous les membres du Département

d'IMMUNOLOGIE de l'Institut Pasteur de Lyon et du Sud-Est.

Leur collaboration a été très précieuse pour la mise en oeuvre de nos études et de nos recherches.

Leur accueil a été pour nous franchement amical et sympathique.

Qu'ils trouvent ici le témoignage d'une sincère amitié.

Nous tenons à remercier spécialement,

Mademoiselle le Docteur GUILLERMET,
Chef du service de Microbiologie générale

Mademoiselle DESBRESLES,
Assistante

Madame KARLIN,
Chef du service des Vitamines.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
I - LES PEPTONES BACTERIOLOGIQUES .	4
A. ETUDE GENERALE DES PEPTONES BACTERIOLOGIQUES .	5
1 - HISTORIQUE.	5
2 - DEFINITION.	7
3 - PROPRIETES DES PEPTONES.	8
3.1. PROPRIETES PHYSIQUES.	8
3.1.1. Solubilité.	8
3.1.2. Chaleur.	8
3.1.3. Le pH.	8
3.1.4. Pouvoir rotatoire.	8
3.1.5. Degré d'humidité.	9
3.1.6. Taux de cendres.	9
3.1.7. Autres propriétés.	9
3.2. ESSAIS CHIMIQUES.	9
3.2.1. Essais des protéines.	9
3.2.2. Autres essais.	11
3.3. ESSAIS MICROBIOLOGIQUES.	12
3.3.1. Essais des Pharmacopées américaine et internationale pour les peptones bactériologiques.	12
3.3.2. Autres essais envisagés.	13
B. ETUDE COMPARATIVE DES PEPTONES BACTERIOLOGIQUES .	14
1 - COMPOSITION.	14
1.1. INFLUENCE DE LA METIERE PREMIERE.	14
1.1.1. Origines non retenues pour la comparaison des peptones.	15
1.1.2. Origines retenues pour la comparaison des peptones.	16
1.2. INFLUENCE DE L'ENZYME.	18
1.2.1. Peptones pancréatiques.	18
1.2.2. Peptones pepsiques.	19
1.2.3. Peptones papaïniques.	20

Pages

1.3. INFLUENCE DES CONDITIONS DE L'HYDROLYSE. 22

2 - LES PEPTONES DANS LES PHARMACOPEES. 22

2.1. PHARMACOPEE FRANCAISE. 22

2.2. PHARMACOPEES ETRANGERES. 23

II - TRAVAIL PERSONNEL .

A. UTILISATION DU PLACENTA ET DE LA PAPAINE POUR LA PRODUCTION DE PEPTONES . 27

B. ESSAIS DE FABRICATION DE PEPTONES PLACENTAIRES . 31

1 - DETERMINATION DES PARAMETRES DE FABRICATION. 31

1.1. CHOIX DES PARAMETRES. 31

1.2. DEROULEMENT DES EXPERIENCES. 32

1.3. ESSAIS DES 16 LOTS DE FABRICATION. 35

1.3.1. Essais physico-chimiques. 35
1.3.2. Essais microbiologiques. 35

1.4. RESULTATS ET COMMENTAIRES. 36

1.4.1. Influence du substrat. 36
1.4.2. Influence de l'enzyme. 37
1.4.3. Influence des conditions opératoires. 44
1.4.4. Influence des traitements postérieurs. 50

2 - PRODUCTION DE PEPTONE EN FERMENTEUR DE LABORATOIRE. 54

2.1. CHOIX DE L'APPAREILLAGE. 54

2.2. CHOIX DES CONDITIONS OPERATOIRES. 54

2.3. RENDEMENT. 55

2.4. LOTS DE FABRICATION. 56

C. ESSAIS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA PEPTONE PLACENTAIRE . 58

1 - ESSAIS PHYSIQUES. 58

1.1. CARACTERES ORGANOLEPTIQUES. 58

1.2. SOLUBILITE. 58

1.3. CHALEUR. 58

Pages

1.4. pH. 59

1.5. HUMIDITE. 59

1.6. CENDRES. 59

2 - ESSAIS CHIMIQUES. 59

2.1. DOSAGE DES ELEMENTS PROTEIQUES. 60

2.1.1. Dosage global des éléments protéiques. 61
2.1.2. Dosage d'un élément de référence. 71

2.2. DOSAGE PROPRE A LA PEPTONE PLACENTAIRE. 72

2.2.1. Dosage des mucopolysaccharides. 74
2.2.2. Rôle des muc.sur la croissance bact. 74
2.3. ESSAIS CHIMIQUES DES PHARMACOPEES. 77

2.3.1. Présence de protéoses. 77
2.3.2. Dosage de l'azote total. 77
2.3.3. Recherche des nitrites. 77
2.3.4. Absence d'indole. 77

2.4. DOSAGE DES PRINCIPAUX ELEMENTS APRES MINERALISATION. 78

2.4.1. Dosage du soufre. 78
2.4.2. Dosage du phosphore. 78
2.4.3. Dosage des chlorures. 79
2.4.4. Dosage du sodium et du potassium. 79

D. ESSAIS MICROBIOLOGIQUES . 80

1- ETUDE COMPARATIVE DE LA PEPTONE PLACENTAIRE AVEC D'AUTRES PRODUITS COMMERCIAUX. 80

1.1. ETUDE DES COURBES DE CROISSANCE VIS-A-VIS D'UN GERME-TEST. 80

1.1.1. Matériel et méthodes. 80
1.1.2. Evaluation biophotométrique de la masse bactérienne. 84
1.1.3. Evaluation photométrique du rendement en germes. 89

1.2. ETUDE DES COURBES DE CROISSANCE VIS-A-VIS DE DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES. 94

1.2.1. Germes aérobies. 95
1.2.2. Germes anaérobies. 116

1.3. COMMENTAIRES SUR L'ETUDE COMPARATIVE. 125

Pages

2 - ETUDE COMPARATIVE DES ESSAIS MICROBIOLOGIQUES GENERAUX. 127

2.1. ESSAIS DES PHARMACOPEES. 127

2.1.1. Production de l'indole. 127
2.1.2. Glucides fermentescibles. 128
2.1.3. Production d'hydrogène sulfuré. 128
2.1.4. Hémolyse sur gélose sang. 129
2.1.5. Pousse de Neisseria gonorrhoae. 129

2.2. AUTRES ESSAIS. 130

2.2.1. Production d'uréase. 130
2.2.2. Milieu de Clark-Lubs. 130
2.2.3. Production de pigments. 131
2.2.4. Test de la bactériostase. 133

3 - DOSAGES DES FACTEURS DE CROISSANCE. 135

3.1. PRINCIPE DES DOSAGES. 135

3.2. DOSAGES DES PRINCIPAUX FACTEURS DE CROISSANCE. 136

3.2.1. Vitamine B 1. 136
3.2.2. Vitamine B 2. 136
3.2.3. Vitamine B 6. 137
3.2.4. Vitamine B 12. 137
3.2.5. Acide folique. 138
3.2.6. Acide pantothénique. 138
3.2.7. Niacine. 138
3.2.8. Méthionine libre. 139

3.3. CONCLUSION. 139

E. PRODUCTION DE TOXINES ET ENZYMES BACTERIENS . 141

1 - ENZYMES ET TOXINES STAPHYLOCOCCIQUES. 143

1.1. PRODUCTION DE STAPHYLOLYSINE. 143

1.1.1. Rappel. 143
1.1.2. La staphylolysine. 143
1.1.3. Titrage de la staphylolysine. 145
1.1.4. Discussion des résultats. 146

1.2. PRODUCTION DE STAPHYLOHYALURONIDASE. 148

1.2.1. Choix de la souche. 148
1.2.2. Choix des conditions opératoires. 148
1.2.3. Dosage de la hyaluronidase. 148
1.2.4. Discussion des résultats. 149

Pages

2 - ENZYMES ET TOXINES STREPTOCOCCIQUES. 152

2.1. PRODUCTION DE STREPTOLYSINE O. 152

2.1.1. Rappel. 152
2.1.2. Choix de la souche. 153
2.1.3. Choix des conditions opératoires. 153
2.1.4. Choix du milieu de culture. 155
2.1.5. Expérience. 156
2.1.6. Titrage de la streptolysine O. 157
2.1.7. Discussion des résultats. 158

3 - ENZYMES ET TOXINES PNEUMOCOCCIQUES. 162

3.1. PRODUCTION DE PNEUMOLYSINE. 162

3.1.1. Rappel. 162
3.1.2. Expérience. 163
3.1.3. Résultats. 164

3.2. PRODUCTION DE STREPTO ET PNEUMOHYALURONIDASE 165

3.2.1. Choix des souches. 165
3.2.2. Dosage. 165
3.2.3. Résultats. 165

4 - TOXINES ET ENZYMES DU BACILLE PYOCYANIQUE. 167

4.1. RAPPEL. 167

4.2. CHOIX DE LA SOUCHE. 167

4.3. CHOIX DE LA TECHNIQUE. 168

4.4. TITRAGE DE L'HEMOLYSINE. 168

4.5. RESULTATS. 170

ICONOGRAPHIE 173

BIBLIOGRAPHIE 175

-- oOo --

INTRODUCTION

Dans le monde bactérien, on a coutume de distinguer :

- les autotrophes, organismes utilisant les substrats oxydables inorganiques, qui sont généralement des germes de la nature, comme les bactéries nitrifiantes et sulfoxydantes ;

- les hétérotrophes, qui utilisent des substrats oxydables organiques, où se placent la plupart des bactéries, et en particulier, les germes rencontrés en pathologie.

Ces microorganismes, incapables de synthétiser en totalité leurs constituants à partir d'éléments minéraux simples, vont exiger, pour leur croissance, des substances particulières, soit des aliments plastiques nécessaires à l'élaboration de leurs structures, soit des sources d'énergie indispensables à ces synthèses.

Ces besoins vitaux sont généralement classés en quatre catégories :

1 - Les aliments essentiels, puisés dans le milieu extérieur, et incorporés dans les cellules par absorption active ou passive ; la plus grande partie de ces éléments est représentée par :

. la source de carbone, dont la variété est très étendue, allant des composés les plus simples (anhydride carbonique, acide acétique) aux plus complexes (hétérocycles et polysaccharides) selon les possibilités de dégradation du microorganisme considéré ; certains Pseudomonas sont capables d'utiliser une centaine de composés variés, tandis qu'à l'opposé, un germe tel que Pseudomonas methanica ne peut utiliser qu'un dérivé carboné, le méthane.

Notons que les glucides, source de carbone habituellement

fournie dans les milieux de culture, pourront être ainsi bien des aliments essentiels que des métabolites essentiels limitant la croissance à un taux maximum, et même des toxiques à fortes doses.

. la source d'azote, assimilée de plusieurs façons chez les hétérotrophes, selon qu'ils utilisent la désamination, la protéolyse, ou l'utilisation de substrats déjà dégradés qu'ils achèveront de transformer en composés directement utilisables, selon leur bagage enzymatique.

Tel est le rôle des polypeptides, protéoses, et acides aminés réunis sous le vocable de peptones, objet de notre travail.

2 - Les métabolites essentiels, produits de transformation des précédents, préformés dans le milieu ou dégradés à l'intérieur des cellules.

3 - Les facteurs de croissance, qui relèvent de la catégorie précédente, mais sont exigés à des taux très faibles, en général inférieurs à 50 µg/ml, dont la liste est également très longue, qu'on a coutume de limiter et d'assimiler aux vitamines, bien que les oligoéléments, acides aminés, bases puriques et pyrimidiques et autres composés aient une action de même type, intervenant soit sur les synthèses, soit sur les régulations, et dont la littérature fournit une multitude d'exemples.

4 - Les facteurs dits stimulants, accélérant le rythme de la multiplication cellulaire, et de départ - nécessaires seulement lors de la première culture en milieu artificiel, mais dont la bactérie acquiert rapidement la possibilité de synthèse.

Ce rappel, volontairement bref, des bases de la physiologie bactérienne est destiné à cerner les buts de notre travail et situer, dans son contexte, le problème du milieu de culture bactérien. Plusieurs remarques s'imposent, en effet :

. l'incroyable variabilité métabolique du monde bactérien montre, et c'est un lieu commun que de la dire, qu'il n'y aura jamais de milieu de culture standard permettant une croissance maximum de tous les microorganismes.

. par là-même, il ne faudra jamais perdre de vue que l'étude d'un seul des composants de ces milieux, fut-il le principal, ne saurait être susceptible de rendre compte de la totalité des réactions qui lient la bactérie à son environnement.

. ceci est particulièrement vrai pour l'étude de ce qu'il est convenu d'appeler la "peptone", composé, non pas défini, mais mélange de substances solubles : peptides, acides aminés, facteurs de croissance et même hormones.

Cependant, est-il possible, comme l'ont cru bon nombre d'auteurs, d'établir une relation entre le pouvoir nutritif et la composition physico-chimique d'une peptone donnée ?

Nous verrons que l'on peut répondre à cette question par la négative, et que le seul procédé valable d'estimation de la valeur d'une peptone est la comparaison microbiologique avec d'autres composés analogues, comparaison devant porter sur un grand nombre d'espèces bactériennes.

Au-delà de l'aspect novateur que constitue la mise au point d'une peptone originale, telle est la thèse que nous nous proposons de défendre.

I - LES PEPTONES BACTERIOLOGIQUES

A - ETUDE GENERALE DES PEPTONES BACTERIOLOGIQUES /

I - HISTORIQUE .

Le terme de peptone est connu depuis fort longtemps, et figurait à la Pharmacopée Française de 1908. A cette date, les procédés de préparation pepsiques étaient mis au point depuis trente ans (126), et les produits obtenus étaient déjà utilisés en thérapeutique.

La première référence connue à l'usage de la "peptone" dans les milieux de culture pour bactériologie remonte à Naegali, qui publia en 1879 une étude comparative du pouvoir nutritif du tartrate d'ammonium et du bouillon de viande. Ce dernier ne tarda pas à s'imposer, donnant le départ aux recherches empiriques portant sur les digestats de composés organiques.

En 1901, Wildiers mit en lumière un fait nouveau : l'existence de substances stimulantes dans les extraits de levure, qu'il appela "Bios Factor", et dégagea la notion de facteur de croissance. La première moitié de ce siècle vit se développer les études de nutrition bactérienne, et en particulier, des éléments indispensables en très faibles quantités au métabolisme d'espèces déterminées : facteurs du sang pour les Hemophilus (Davis, 1917), acides aminés pour le bacille tuberculeux (Duval, 1910) ou le méningocoque (Campbell, 1918), pour ne citer que les premières découvertes.

L'année 1914 vit la mise sur le marché de la première application commerciale, la "Bacto-peptone Difco", suivie de beaucoup d'autres. On passa en revue toutes les matières premières envisageables - viande, lait, farines, etc. - et tous les procédés de digestion - enzymatiques, hydrolyses... -

Entre 1935 et 1938, paraissent trois publications rassemblant la synthèse des connaissances sur les peptones :

la brochure de Vaillant (164) et les thèses de Ducloy (47) et de Morschoisne (109), établissant les premières études comparatives des peptones.

La seconde guerre mondiale obligea les microbiologistes à chercher de nouvelles voies en raison de la raréfaction des denrées habituellement utilisées, comme on le verra par la suite.

Il subsista jusqu'aux années 1960 un grand nombre de produits de valeur inégale, dont la plupart ont aujourd'hui disparu.

A cette époque, parurent trois autres publications, destinées à comparer l'activité microbiologique de ces préparations : l'une, les travaux de Khesgi (81), les deux autres sont françaises: la remarquable étude de Bernard et Lambin de la Faculté de Pharmacie de Paris (15-16), celle de Desbordes et Ninard du Laboratoire National de la Santé Publique, ont constitué la base même de notre travail (43).

Des auteurs allemands ont insisté, ces dernières années, sur les rapports possibles entre l'activité microbiologique et l'analyse chimique, sans parvenir à des conclusions concordantes (84) (119) (180).

Le problème reste d'actualité (40), et l'on peut regretter qu'il n'existe pas, à notre connaissance, d'ouvrage synthétique sur ces questions fondamentales, phénomène dû, en partie, à des impératifs de secret industriel : le mutisme des laboratoires à propos de leurs préparations passées et présentes oblige le chercheur à reconsidérer le problème à la base, tant en ce qui concerne la fabrication que les contrôles, et même la bibliographie, freinant le développement de la connaissance scientifique en ce domaine.

2 - DEFINITION .

Sous ce vocable de "peptones" sont rangées un ensemble de préparations très différentes les unes des autres, quoique possédant un certain nombre de caractères communs.

Voyant la définition qu'en donne la Pharmacopée française : "mélange de peptides et d'aminoacides obtenu par action de la pepsine, de la pancréatine ou de la papaïne, sur diverses matières protéiques" (123).

Définition dont l'imprécision amène plusieurs remarques :

- de toute évidence, d'autres procédés enzymatiques peuvent être utilisés ; il sera donc plus juste de parler seulement d' "enzymes protéolytiques", sans en préciser la nature.

- l'exclusion de produits préparés par hydrolyse acide, et connus en France sous le nom d'hydrolysats, est extrêmement préjudiciable et expose à des confusions regrettables.

- enfin, notre Pharmacopée n'établit, comme certains le font, aucune espèce de différence dans l'usage des peptones ; or, les qualités que l'on peut demander à des peptones bactériologiques ne sont pas les mêmes que celles qu'on exige des peptones thérapeutiques : ce qui sera indiqué lors de l'étude de leurs propriétés.

Comme le soulignent Desbordes et Ninard (43), il s'agit de produits uniquement définis par leur préparation, et celle-ci dépend de trop de facteurs pour être codifiée sans contestation.

Il importe donc de proscrire les termes imprécis de "peptone" ou "hydrolysat", mais lorsque ce sera le cas, de parler de "peptone bactériologique" et d'y adjoindre le procédé utilisé pour sa réaction (hydrolyse acide ou dénomination de l'enzyme), la dénomination de la matière première, et même la

dénomination du laboratoire producteur, puisque les conditions de préparation influent considérablement sur le produit fini.

3 - PROPRIETES DES PEPTONES .

Cependant toutes ces préparations ont entre elles un certain nombre de points communs, étudiés par les auteurs, ou de réactions imposées par les Pharmacopées. Résumons ces propriétés.

3.1. PROPRIETES PHYSIQUES .

3.1.1. Solubilité.

Les peptones sont entièrement solubles dans l'eau (5 à 10 p. 100) sans présence de trouble ou de dépôt, mais insolubles dans l'éther, et peu solubles dans l'alcool.

3.1.2. Chaleur.

Elles ne précipitent pas par la chaleur en solution acide ou alcaline. Après passage à 120° pendant 15 minutes, il ne doit y avoir ni flocons, ni trouble intense. Un nouveau passage à l'autoclave ne doit également pas provoquer de phénomène semblable dû à la présence éventuelle de protéines non digérées (31).

3.1.3. Le pH.

Il doit être voisin de 6 $\pm$ 0,5, parfois légèrement plus acide bien que certains produits commerciaux se soient révélés neutres, ou à peine alcalins.

3.1.4. Pouvoir rotatoire.

Les peptones pepsiques auraient un pouvoir rotatoire lévogyre supérieur à 40°, alors que celui des peptones pancréatiques serait inférieur à cette valeur. Ceci a beaucoup été

discuté, et il a été montré que cette différenciation était souvent illusoire et ne pouvait être retenue (109).

3.1.5. *Degré d'humidité*.

Point important, puisqu'il est souvent le reflet de la conservation de ces produits très hygroscopiques. De plus, il peut fournir une indication sur le procédé de dessication utilisé. Il varie entre 3 et 15 p. 100, une valeur plus élevée indiquant une altération de la préparation (31).

3.1.6. *Taux de cendres*.

Compris entre 1 et 11 p. 100 selon que les peptones sont pepsiques (1 à 8 p. 100) ou pancréatiques, il doit se situer autour de 8 p. 100.

3.1.7. *Autres propriétés*.

Point d'abaissement cryoscopique, conductibilité électrique, tension superficielle ont été examinés, sans grand résultat (15).

3.2. *ESSAIS CHIMIQUES* .

3.2.1. *Essais des protéines*.

3.2.1.1. *Absence de protéines non digérées*.

On ne doit obtenir de précipitation ni par action de la chaleur, ni par addition des réactifs classiques des albumines (acide nitrique, mélange éthanol-acide acétique) en solution à 5 p. 100.

3.2.1.2. *Présence de protéoses*.

Obtention d'un précipité plus ou moins abondant, avec l'acide phosphotungstique ou une solution saturée de sulfate de zinc, ou d'une coloration violacée par le réactif du biuret.

3.2.1.3. Recherche de certains acides aminés aromatiques.

Elle a été considérée par beaucoup d'auteurs comme la preuve d'une digestion pancréatique avancée. On a utilisé :

- la réaction du tryptophanne libre: à l'eau de brome ou au réactif d'Adamkiewicz.

- la réaction de la tyrosine : recherchée jadis par addition de tyrosinase, ou par le réactif de Millon, a été également considérée comme le signe d'une dégradation poussée. En fait, elle dépend surtout de la richesse en tyrosine du substrat, de même que la réaction précédente. Actuellement, les techniques de chromatographie ont bouleversé les méthodes anciennes.

3.2.1.4. Dosages des différentes formes de l'azote.

L'azote, sous ses différentes formes, fournit certainement une indication plus intéressante sur la valeur de l'hydrolyse, et donne une idée du mode de préparation de la peptone.

- L'azote total est dosé généralement par la méthode de Kjeldhal, ce qu'indiquent toutes les pharmacopées, et la plupart des auteurs. Les teneurs exigées varient entre 10 et 15 p. 100.

- Azote aminé : recherché par formol-titration dans la Pharmacopée française, et variant entre 3 et 6 p. 100, c'est, semble-t-il, la valeur la plus intéressante que l'on puisse retenir. Sa détermination pose d'ailleurs des problèmes que nous commenterons dans un prochain chapitre (123).

- Le rapport azote aminé/azote total : également demandé par la Pharmacopée française, permet théoriquement d'établir une distinction entre les peptones pancréatiques (autour de 0,40) et pepsiques (autour de 0,20). On a voulu en faire également une appréciation de la valeur globale de la peptone, opinion sujette à caution, comme nous le verrons.

3.2.2. *Autres essais*.

Ils sont destinés à rechercher ou à doser les éléments qui pourraient se montrer toxiques à forte concentration, ou constituer une gêne dans la réalisation des essais microbiologiques.

3.2.2.1. *Présence à un taux acceptable*.

- de soufre organique : de l'ordre de 0,50 p. 100, il reflète la richesse de la préparation en aminoacides soufrés.

- de chlorures : de traces, peut aller jusqu'à 10 p. 100 (peptones pepsiques).

- d'oligoéléments : fer, cuivre, zinc, manganèse à l'état de traces.

- d'histamine : moins de 100 µg/g.

3.2.2.2. *Absence*.

- de nitrites : recherchée par la coloration rose-rouge à l'aide du réactif de Griess.

- de sucres réducteurs : par la liqueur de Fehling.

- d'indole : par le paradiméthylaminobenzaldehyde.

Remarquons, d'ores et déjà, que certaines de ces propriétés intéressent spécifiquement les peptones thérapeutiques (absence de protéines non digérées, d'histamine), tandis que d'autres n'auront de sens qu'en fonction des tests microbiologiques (présence de tryptophame ou absence de sucres fermentescibles). On retrouve donc la fâcheuse confusion à laquelle nous avions fait allusion. Nous verrons plus loin quels essais ont été retenus par la Pharmacopée française.

3.3. *ESSAIS MICROBIOLOGIQUES*.

Il apparaitra clairement au cours de notre étude que les essais physico-chimiques sont tout-à-fait insuffisants pour déterminer la valeur nutritive d'une peptone bactériologique. Celle-ci devra, en effet, permettre la réalisation des principaux tests destinés ordinairement à l'identification des germes, mais aussi permettre une pousse régulière des bactéries les plus couramment rencontrées, en particulier en pathologie humaine ou animale.

Ces essais sont nombreux : nous nous contenterons, pour l'instant, de les énumérer, puisqu'ils seront décrits et commentés dans la partie pratique de ce travail.

3.3.1. *Essais des Pharmacopées américaine et internationale pour les peptones bactériologiques*.

- Valeur nutritive : la solution de peptone à 2 p. 100 additionnée de 0,50 p. 100 de chlorure de sodium et 1,50 p. 100 de gélose doit permettre la pousse de Escherichia coli, Aerobacter aerogenes, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus en moins de 24 heures.

- Obtention de zones d'hémolyse sur gélose sang avec un pneumocoque et un streptocoque du groupe A ou B.

- Pousse de Neisseria gonorrhoae en gélose chocolat après 48 heures en atmosphère d'anhydride carbonique.

- Aptitude à la production d'indole, d'hydrogène sulfuré, d'acétylmethylcarbinol.

- Absence de sucres fermentescibles pour la peptone pancréatique de caséine.

3.3.2. *Autres essais envisagés*.

- Influence de la modification des caractères physico-chimiques du milieu peptone sur la pousse, ainsi que de la dilution et de la pression osmotique.

- Recherche et dosage microbiologique des facteurs de croissance, en particulier des vitamines du groupe B.

Pour chacune de ces réactions, devront être déterminées les souches choisies et les conditions du milieu. D'autres réactions complémentaires seront essayées, s'intéressant plus spécifiquement à des germes donnés, telles que la pigmentation des Pseudomonas. Elles permettront d'orienter les recherches sur la spécificité d'action éventuelle de la peptone due à ses caractères propres.

Tous les essais ci-dessus décrits ne sont pas indispensables à pratiquer. Notre travail doit servir, essentiellement, de préciser quelles réactions peuvent ou doivent être choisies pour aboutir à une appréciation convenable de la valeur nutritive d'une peptone.

B - ETUDE COMPARATIVE DES PEPTONES BACTERIOLOGIQUES /

I - COMPOSITION .

Il importe d'étudier les facteurs dont dépendent la variété et la qualité des préparations commerciales. Classiquement, on s'accorde à reconnaitre que la composition varie selon :

- la matière première utilisée,
- l'enzyme servant à la dégradation,
- les conditions opératoires.

Examinons de plus près ces trois points.

1.1. INFLUENCE DE LA MATIERE PREMIERE.

De très nombreux produits organiques avaient été retenus dans le passé, par les industriels :

- tissus animaux : os, muscle, poisson (158) - et même baleine ! (150).
- organes particuliers : foie, coeur, cervelle, organes foetaux.
- sang et protéines sanguines - hémoglobine, fibrine.
- lait et caséine, oeuf et ovalbumine.
- produits végétaux : gluten, soja, arachide.
- microorganismes : levures.

Il est bien évident que le choix de la matière première est influencé autant par les critères économiques que bactériologiques. Les préparations commerciales sont très nombreuses, et tout le problème, au cours de notre travail, résidait dans le choix d'une demi-douzaine de spécialités aptes à être comparées avec le produit à étudier.

1.1.1. *Origines non retenues pour la comparaison des peptones.*

1.1.1.1. *Peptones de gélatine.*

Pour leur faible qualité nutritive, due, notamment, à leur carence totale en tyrosine et en tryptophane, qui les rend totalement impropres à la culture de certains germes, et n'assure aux autres qu'une faible pousse, donc inutilisable pour certains tests biochimiques.

1.1.1.2. *Peptones d'oeuf.*

Très peu utilisées en bactériologie, (si ce n'est pour la culture des Mycobactéries, malgré leur assez bon pouvoir nutritif : extrait d'oeuf entier ou réduit à l'ovalbumine), sans doute en raison de leur prix élevé. Cette remarque est valable pour les peptones dérivées d'organes animaux, qui nécessitent des prélèvements et des traitements dont l'effet influe, bien sûr, sur les coûts.

1.1.1.3. *Peptones de levures.*

Nous les avons éliminées, (malgré leur très grande valeur, notamment leur quotient très élevé en vitamines, qui les placent parmi les meilleurs produits commerciaux), en considérant qu'il s'agit non pas d'une matière première brute, mais du résultat d'une fermentation - produite avec des substances analogues aux peptones -, et qu'elles ne sont introduites dans les milieux de culture qu'à un taux faible, destiné à pourvoir le milieu en facteurs de croissance (vitamines du groupe B).

1.1.1.4. *Peptones d'origine inconnue.*

Aussi invraisemblable que cela paraisse, certains laboratoires n'indiquent même pas leur matière première d'origine. Il va de soi qu'on ne saurait les retenir pour une étude comparative.

1.1.1.5. "Hydrolysats acides".

Malgré leur contenu très important en acides aminés (jusqu'à 40 p. 100 de l'azote total), tous les auteurs s'accordent à leur reconnaitre un faible pouvoir nutritif, en raison, sans doute, de la destruction quasi-totale des facteurs de croissance, due à la température élevée et aux conditions opératoires (15-16).

1.1.2. Origines retenues pour la comparaison des peptones.

En fonction de leur qualité nutritive, de leur grande utilisation, de leur mode de préparation et de leur coût.

1.1.2.1. Peptones de caséine.

Parmi les nombreux produits lactés préparés par les laboratoires : protéines du lactosérum (Milk protein hydrolysate BBL), lactalbumine digérée (Lactosylate BBL), c'est surtout la caséine qui a été exploitée (9).

La Sheffield Chemical ne commercialise pas moins de 15 types différents d'hydrolysats de caséine. (*)

On remarque leur haute teneur en tryptophane, en acide aspartique, glutamique, et en proline, leur pauvreté en acides aminés soufrés - peu de cystéine, peu de méthionine - et en vitamines, ces dernières étant présentes à un taux assez bas, même par digestion enzymatique.

Ceci, nous l'avons constaté, en fait un milieu assez pauvre, bien que recommandé par la Pharmacopée internationale, et la Pharmacopée américaine, la National Formulary et la Food and Drug Administration pour la recherche des organismes de l'eau, du lait et des autres milieux naturels.

Il semble, en fait, que, s'ils ne permettent pas une culture luxuriante des organismes exigeants, ces milieux

---

(*) Sheffield Chemical, 2400 Morris au, Union, NJ 07083, (201) 686-3440.

favorisent du moins les réactions biochimiques des germes, comme on le verra plus tard.

Nous avons retenu, pour tous nos essais, la peptone de caséine dite Trypticase (BBL) et la trypticase/soja (BBL), qui associe 95 p. 100 de peptone de caséine à 5 p. 100 de peptone de soja. Il est apparu, en effet, que ce mélange semble un des meilleurs milieux de culture existant sur le marché des peptones. Le manuel des Produits de Laboratoire BBL (9) recommande l'emploi de ce composé pour la culture de pratiquement tous les germes exigeants et même pour la culture des protozoaires.

1.1.2.2. Peptones de soja.

Ce sont les plus utilisées des peptones végétales, sans doute en raison de leur haute teneur en protéines, mais aussi du coût peu élevé de cette production.

Riches en phosphoprotéines, en arginine, et en vitamines (Thiamine) (83), elles sont recommandées pour la culture des germes exigeants, notamment des Neisseria (9).

A noter, cependant, leur relative richesse en hydrates de carbone, qui, en principe, interdit l'étude des fermentations sucrées.

1.1.2.3. Peptones de viande et de tissus animaux.

Ce sont les premières qui aient été préparées depuis Naegali, et les premières commercialisées (protéose-peptone), et elles sont encore très employées malgré la disparition de quelques-unes, en particulier la peptone de Chapoteau, (hydrolyse pepsique de viande bovine) que regrettent encore beaucoup de microbiologistes.

Réalisées à partir de tissu musculaire, de composition très stable dans le règne animal, elles renferment le matériel nécessaire à la formation de toute matière organique.

Nous en avons retenu deux, à savoir la protéose peptone 3 Difco et la thiotone BBL, en raison de leur différence dans la composition chimique et le mode de préparation, plus une préparation mixte dite viande-foie (viande de boeuf dégraissée + foie de boeuf dégraissé hydrolysés par la pepsine), très employée pour la culture des anaérobies.

1.2. *INFLUENCE DE L'ENZYME.*

Elle est déterminante, car de son action dépend la composition chimique des produits obtenus.

D'une manière générale, la réaction de dégradation suit le schéma ci-dessous, d'après Kludas (85) :

Protéine → Protéose (PM ~ 5 000) → "Peptone" (PM ~ 200) →

Peptide (PM 100 à 500) → Dipeptide (PM ~ 200) → Aminoacides (PM ~ 100

Ces réactions se poursuivent partiellement jusqu'au stade final d'acides aminés, dont le taux ne dépassera pourtant jamais 6 p. 100 pour les préparations enzymatiques.

1.2.1. *Peptones pancréatiques.*

On utilise à cette fin une poudre de pancréas grossièrement purifiée, afin de ne retenir que les enzymes protéolytiques.

Avrameas (3) a isolé de l'extrait aqueux, outre la trypsine : des chymotrypsines, des carboxypeptidases, de l'élastase, ainsi que 7 autres composés à activité enzymatique.

- la trypsine scinde les liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagées les carboxyles d'un acide aminé basique : lysine ou arginine.

- la chymotrypsine hydrolyse la liaison peptidique dans laquelle est engagé le carboxyle d'un acide aminé aromatique.

- les carboxypeptidases A et B réalisent la libération d'acides aminés terminaux d'une chaine peptidique.

- ceci pour les principales enzymes : on voit donc qu'une telle activité est extrêmement complexe, que la modification, même légère, d'un des facteurs fera varier certainement la cinétique de la réaction, et que la présence dans cette poudre d'organe de glucidases et de lipases peut être nuisible au produit obtenu, par libération de substances indésirables.

La digestion pancréatique conduit à des produits azotés très dégradés, avec une proportion élevée de dipeptides et d'acides aminés libres, permettant souvent les réactions du tryptophane et de la tyrosine libres.

1.2.2. *Peptonés pepsiques*.

En milieu chlorhydrique, l'action de la pepsine sur les protéines est bien connue, en particulier l'attaque préférentielle au niveau de la L - phénylalanine et de la L - tyrosine. Les auteurs ont beaucoup discuté sur les stades terminaux de la digestion qui s'arrête en très grande partie au stade de composés peptidiques, avec une faible libération d'acides aminés. Il semble que le substrat ait une grande influence sur la réaction, et que les protéoses obtenues soient de composition très variable.

Certains auteurs ont conclu de la présence de protéines peu dégradées et du faible taux d'acides aminés que ces peptones étaient impropres à fournir des cultures abondantes. Nous verrons qu'il n'en est rien, puisque la Thiotone, préparation pepsique de muscle, a pratiquement toujours donné de bons résultats.

L'indépendance entre le taux d'acides aminés et la qualité nutritive sera, d'ailleurs, une des principales idées que nous défendrons dans la partie pratique de ce travail.

1.2.3. *Peptones papaïniques*.

La papaïne est un composé extrait du latex de Carica papaya ; on a cherché à purifier ce latex, afin d'en séparer les éléments non protéolytiques (116).

Les auteurs ont distingué plusieurs actions qui seraient liées à des enzymes différentes :

- la papaïne I (PM de 20 000 à 27 000), agissant entre le pH 5,0 et 7,5.

- la chymopapaïne (PM de 45 000) qui coagule le lait et, à l'inverse de la précédente, est stable en milieu acide, mais deux fois moins active.

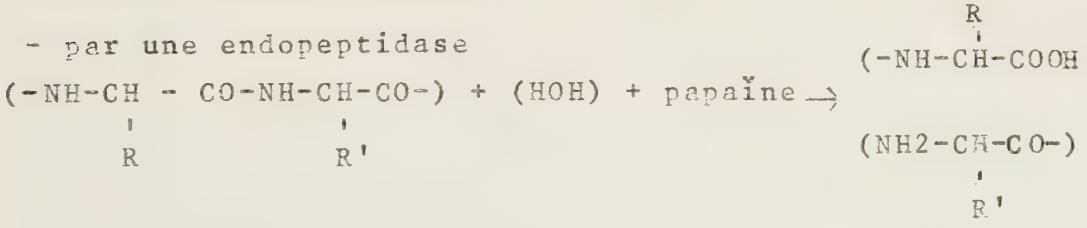
Mais on a séparé des papaïnes cristallisées hydrosolubles dont l'activité protéolytique est multipliée par 10 par rapport au produit brut.

Au point de vue chimique, la nature du principe actif n'est pas connue, bien qu'on ait noté la présence de groupements SH_2 et que l'on ait commencé à déterminer des séquences d'acides aminés (46) (93).

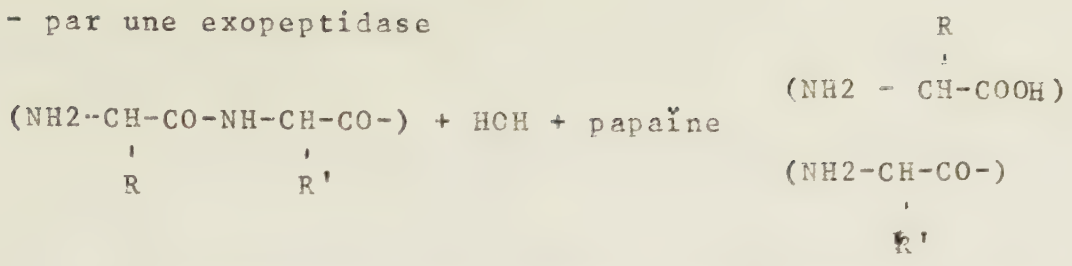
Pour Schechter, le site serait une endopeptidase composée de 7 subsites.

Son action se situe au niveau des groupements prosthétiques en donnant naissance à des peptides de plus en plus dégradés, par dédoublement des molécules protéiques :

- par une endopeptidase



- par une exopeptidase



Cette double action provoque une protéolyse très rapide, dont les dérivés finaux sont à mi-chemin entre ceux qu'on obtient par action de la pepsine et ceux de la pancréatine.

Mais les conditions opératoires, en particulier, ont une très grande importance, rappelons-le :

L'optimum d'action est assez large, entre pH 5,5 et pH 7 en général, bien qu'il soit de 5 pour la gélatine et de 2,5 et 11 (deux optima) pour la fibrine. Il semble d'ailleurs que les réactions chimiques soient différentes selon le pH.

La température, elle aussi, pourra varier entre 40° et 80°, l'enzyme s'inactivant à 83° : l'optimum de la digestion de la fibrine se situe à 70°, celle de la caséine à 40° (83).

Enfin, notons que de nombreux agents diminuent son activité (oxygène, acide monoiodacétique) (461), tandis que d'autres l'exhaltent : c'est le cas des substances réductrices : HCN, H_2S, cystéine, thiol, citrate (28).

Il y a peu de peptones papaïniques dans le commerce. Nous avons retenu la Phytone BBL, peptone papaïnique de soja, également en raison de ce mode de préparation.

Nous avons insisté sur la papaïne, car c'est l'enzyme que nous avons finalement choisie pour la réalisation de notre peptone, précisément à cause de son action très étendue, intermédiaire de celle des autres enzymes, particulièrement intense sur la décomposition des tissus connectifs riches en mucopolysaccharides,(abondants notamment dans le placenta humain)(59).

On aura l'occasion de revenir sur sa conservation et son dosage, dans la partie consacrée à sa préparation.

1.3. *INFLUENCE DES CONDITIONS DE L'HYDROLYSE.*

Entièrement tributaires de l'enzyme et du substrat, il n'y a pas de conditions de préparation standard.

Il faudra déterminer des optima pour :

le pH, la température, la qualité de l'enzyme et sa quantité, l'agitation, le temps, la filtration et l'autoclavage.

Il y a lieu aussi de tenir compte de la qualité de la matière première, exposée à la putréfaction en l'absence de précautions. Ces questions seront également développées ultérieurement.

2 - *LES PEPTONES DANS LES PHARMACOPEES* .

2.1. *Pharmacopée Française.*

L'édition de 1968 (la monographie n'ayant pas encore paru à la dernière édition) réunit en un seul article toutes les peptones, quelles que soient leur origine et leur préparation.

Elle fait rechercher :

- l'absence de protéines non digérées par l'acide nitrique.
- la solubilité dans l'eau et l'insolubilité dans l'alcool.
- les taux d'humidité (moins de 6 p. 100) et de cendres (moins de 9 p. 100).
- l'absence d'indole libre par le paradiméthylaminobenzaldéhyde.
- la teneur en azote aminé et en azote total, ainsi que le rapport entre ces deux valeurs.

La "peptone bactériologique" est mentionnée dans la

rubrique "méthodes générales d'analyses", sans donner d'autre spécification.

2.2. *Pharmacopées étrangères*.

2.2.1. Les pharmacopées italienne, anglaise, autrichienne, suisse et danoise ne mentionnent même pas la peptone, de même que la pharmacopée Européenne.

2.2.2. La pharmacopée belge reconnait deux sortes de peptones, l'une provenant de toutes origines, l'autre spécifiquement de caséine, en précisant qu'il s'agit d'un produit à usage bactériologique, mais sans faire mention d'aucun essai.

2.2.3. L'extra pharmacopeiae Martindale de 1972 (124) y fait allusion, sans préciser d'essai ni d'usage bactériologique.

2.2.4. Les pharmacopées des Etats-unis et Internationale (125) (121) sont les seules à mentionner des recherches très complètes le tableau ci-joint (I) expose les essais exigés par chaque pharmacopée, et précise si les peptones sont destinées à l'usage bactériologique.
Remarquons que la pharmacopée américaine distingue deux peptones bactériologiques : le digestat pancréatique de caséine et le digestat pepsique de tissu animal.

- Les essais chimiques pratiqués sur ces deux composés sont identiques, et demandent, outre les essais déjà mentionnés à la pharmacopée française (protéines non digérées, taux d'azote, de cendres et d'humidité), une absence de nitrites, la présence de protéoses à un taux acceptable et la présence de tryptophane.

- Les essais microbiologiques font rechercher :

. pour les deux peptones, l'aptitude à la production d'indole, d'acéthylméthylcarbinol, et d'hydrogéne sulfuré.

. pour la peptone de caséine, l'absence de sucres fermentescibles, des essais de pousse sur plusieurs germes, l'obten-

tion de zones d'hémolyse sur gélose au sang avec un streptocoque ou un pneumocoque hémolytiques, la pousse du gonocoque sur gélose chocolat après 48 heures.

. pour la peptone de tissu animal, la présence de sucres fermentescibles, le degré de contamination global et les essais de pousse précédents.

Les essais de la pharmacopée internationale sont identiques. On peut donc remarquer que ces essais concernent un type particulier de peptone, et non point "la peptone bactériologique", et qu'il n'est pas précisé si ils s'appliquent à toute autre préparation.

Tableau comparatif des qualités requises par les Pharmacopées pour les peptones (Tableau I)

Pharmacopée	Origine	Enzyme	Solubilité	Teneur protéines	Teneur protéoses	Dosage N total	Absence indole	Absence nitrites	Présence tryptoph.	Cendres	Perte Dessiccation	Usages
Internationale	Caséine Soja Levure	Pancréat. Papaïnique –	+ + –	+ + +	+ + –	> 10 % > 10 % 7–9,5%	+ + –	+ + –	+ + –	< 15 % < 15 % < 15 %	< 7 % < 7 % < 5 %	Bact. Bact. –
Américaine	Caséine Tissu Viande Soja	Pancréat. Pepsique – Papaïnique	+ + + +	+ + + +	+ + + +	> 10 % > 10 % 14–15% > 10 %	– – – –	+ + – –	+ + – –	< 15 % < 15 % < 5 % < 15 %	< 7 % < 7 % < 7 % < 7 %	Bact. Bact. – –
Française	Toutes	Pancréat. Pepsique	+	+	–	> 12 %	+	–	–	< 5 %	< 5 %	–
Belge	Toutes Caséine	Pancréat. Pepsique Pancréat.	+ – –	+ – –	– – –	13–16%	+ – –	– – –	– – –	– – –	– – –	– Bact.
Espagnole	Viande	Pepsique	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–

II - TRAVAIL PERSONNEL

PRODUCTION PAR DIGESTION PAPAINIQUE D'UNE PEPTONE BACTERIOLOGIQUE A PARTIR DE RESIDUS INDUSTRIELS DE PLACENTAS HUMAINS.

A - *UTILISATION DU PLACENTA ET DE LA PAPAINE POUR LA PRODUCTION DE PEPTONES /*

- La papaïne est connue depuis fort longtemps, puisqu'elle a été décrite par Vauquelin en 1802, qui la nomma "sang végétal".

On lui préféra longtemps la pepsine et la trypsine pour la fabrication des peptones, en raison de l'obtention plus aisée de ces enzymes, bien que les peptones papaïniques aient été longuement décrites dans l'ouvrage de Javillier en 1908 (78).

La pénurie de ces composés durant la dernière guerre poussa Ramon et Pochon (135) à l'utiliser pour hydrolyser de la viande de cheval impropre à la consommation humaine : ces chercheurs constatèrent que les préparations réalisées avaient un pouvoir nutritif égal, et parfois supérieur à celles qu'on connaissait déjà, en particulier pour la production de toxines bactériennes (136 à 139). Brisou et Babin (24-25), utilisant un bouillon de viande - foie papaïné pour la culture des anaérobies, parvinrent aux mêmes conclusions.

Cependant, la papaïne reste, à l'heure actuelle, peu utilisée : notons toutefois l'hydrolysat papaïnique de foie de porc (Oxoid) (117) et la phytone (BBL), peptone papaïnique de soja (9).

- Le placenta humain a été surtout connu en thérapeutique (outre les dérivés du sang et les hormones qu'on en retire actuellement), par les extraits placentaires de Filatov : Rappelons qu'en 1934, ce chercheur émit la théorie que certains tissus conservés en survie dans des conditions défavorables produisaient des "biostimulines", substances activant les processus vitaux, ou stimulant la régénération tissulaire.

Cette question a été particulièrement étudiée à Lyon (36) (37) (4-5-6) et plus récemment à Clermont-Ferrand (17).

Il subsiste actuellement des produits commerciaux basés sur la méthode de Filatov, sans que les chercheurs aient réussi à s'accorder sur leur activité respective (75).

Du point de vue microbiologique, c'est également la raréfaction, due à la guerre, des matières premières utilisées - en particulier de la viande - qui fit songer à utiliser le placenta humain pour la production de peptones, par hydrolyse pepsique.

C'est ce que firent, avec succès Prévot et Taffanel, à l'Institut Pasteur de Paris, en 1944 (129), et Sohrab à Téhéran en 1943 (156).

Tous ces auteurs constatèrent la supériorité des milieux ainsi préparés sur les produits traditionnels, en particulier pour la croissance des anaérobies et la production de toxines.

"Ce milieu, écrit Prévot, persistera après la guerre, alors que la viande sera redevenue abondante, car ses qualités le placent nettement au-dessus de tous les autres milieux employés jusqu'ici pour les anaérobies"(129).

Cependant, il n'en fut rien : cette matière première, jusqu'alors gratuite et abondante, devint très recherchée lorsqu'on songea à utiliser le sang placentaire pour la préparation de l'albumine et des immunoglobulines. Les placentas, recueillis dans le monde entier, sont, depuis lors, broyés et compressés pour en extraire le sang, le résidu servant à des fins moins nobles, telles que la confection d'engrais.

Or cet organe méconnu présente une extrême richesse en substances organiques propres à la croissance bactérienne - acides aminés, enzymes, vitamines, hormones, et éléments minéraux. Berger a consacré un opuscule extrêmement complet à ce sujet (12).

Nous avons donc songé à utiliser ce résidu frais pour l'obtention d'une peptone d'un type nouveau.

La bibliographie nous révéla l'existence de travaux japonais faisant l'objet d'un brevet, et portant sur une préparation papaïnique de placenta entier (114). Cependant, les conditions de l'hydrolyse (12 heures à 55°), la température de thermocoagulation élevée (121°) et la faiblesse du rendement (moins de 10 p. 100) sont très différentes du mode de préparation que nous avons été amenés à déterminer, mode de préparation que nous croyons plus apte à préserver la qualité microbiologique de la peptone obtenue.

L'étude bibliographique n'a pas révélé d'autres antécédents à notre recherche, tant dans les revues spécialisées qu'à l'Institut de la propriété industrielle. Les autres brevets concernant l'utilisation du tissu placentaire ne mentionnent pas d'application microbiologique (110) (22).

A noter cependant :

- L'utilisation d'hydrolysats placentaires en dermatologie et en cosmétologie, très étudiée à Lyon (36) (37), dont l'intérêt s'est maintenu jusqu'à aujourd'hui.

- Ainsi que des études portant sur l'utilisation de peptones placentaires pour l'alimentation parentérale (41) (8), voie de recherche qui pourrait se montrer intéressante malgré les obstacles pharmacologiques (48).

Nous avons résumé dans le tableau (II) les quelques informations que l'on peut retirer de cette étude bibliographique quant à la fabrication des peptones.

Les techniques de fabrication des peptones : tableau comparatif (II)

Auteurs	Matière première		Enzyme		Conditions		Utilisations
	qualité	quantité (par l. eau)	qualité	quantité (par l. eau)	températ.	temps	
Cassagne (31)	viande dégraissée	200 g	papaïne	1,5 g titre = 80	50° 85°	3 h	Enz. staphylo.
Ramon (136)	viande cheval	200 g	papaïne	2 g titre = 80	50° 85°	1 h	Tox. diphté-rique
Ramon (135)	muscle + foie cheval	205+50 g	pepsine	0,55 g titre = 500	48°	20 h	Tox. tétanique
Ramon (138)	viande + foie cheval	200+50 g	pepsine	1 g	50° 85°	1 h	Tox. tétanique
Frison (24)	viande + foie veau	250+250 g	papaïne	?	?	?	Anaérobies
Pelin (10)	viandes extra	225 g	papaïne	2 g	35°	24 h	Toutes
Prévot (129)	placenta humain frais	220 g	pepsine	2,5 g titre = 500	55°	20 h	Anaérobies
Tchurch (150)	placenta humain cuit (résidu)	330 g	pepsine	0,3 g	55°	20 h	Germes exigeants
Prévot Japon (114)	placenta humain frais	1500 g	papaïne		50-60°	10 h	Germes exigeants

B - *ESSAIS DE FABRICATION DE PEPTONES PLACENTAIRES* /

1 - *DETERMINATION DES PARAMETRES DE FABRICATION* .

Le problème majeur de la préparation a été, et reste, d'ailleurs, l'ignorance complète dans laquelle nous nous sommes trouvés de la technologie industrielle des peptones, c'est-à-dire de l'expérience accumulée par les laboratoires fabricants au fil du temps, puisque Difco, par exemple, réalise de tels traitements depuis près de soixante-dix ans. Il n'est pas douteux que les observations et l'habitude ont dû amener à la mise au point de méthodes assez spécifiques.

Malheureusement, et pour des raisons évidentes, les détails de ces opérations sont absents de la littérature, comme nous l'avons vérifié. Il a donc été nécessaire de reprendre le problème à la base.

Cette étude a donc été faite sur le modèle des techniques de fermentation, dont, finalement, les appareils et les méthodes diffèrent assez peu.

1.1. *CHOIX DES PARAMETRES*.

Ils sont nombreux. Nous avons choisi d'étudier le comportement de notre substrat dans les conditions suivantes :

- quatre températures :	55°	60°	65°	75°
- quatre pH différents :	6,5	7	7,50	8
- quatre concentrations d'enzyme :	0 %	0,2%	0,4%	0,6%
- quatre dilutions aqueuses du substrat: (100 g)	100ml	200ml	300ml	400ml
- quatre durées différentes de digestion :	1 h	2 h	3 h	4 h

L'idéal aurait, bien sûr, été de croiser entre eux tous ces paramètres. Malheureusement, cela eût nécessité un temps et un matériel qui n'étaient pas compatibles avec le déroulement de notre travail. Nous avons donc restreint le nombre de préparations effectuées à 16, en considérant que le comportement de chacun des facteurs de la réaction était relativement indépendant des autres.

Un tableau ci-joint résume les conditions de l'étude.

1.2. DEROULEMENT DES EXPERIENCES.

- Préparation de la matière première : décongélation des résidus placentaires(*) suivie d'un broyage au moyen d'un broyeur à viande.

- Pesée exacte de 100 g de matière première dans un erlen de 500 ml, et mise en solution dans une quantité d'eau déterminée, chauffée à une température telle que le mélange eau chaude - placenta fraichement décongelé atteigne la température de l'expérience. (ceci étant déterminé par un calcul classique) (31).

- Addition de l'enzyme en quantité voulue, en solution dans l'eau distillée, préparée extemporanément.

- Ajustement au pH voulu.

- Mise en incubation dans un bain-marie porté, au préalable, à la température désirée.

- On laisse la digestion s'effectuer durant le temps choisi, en agitant toutes les 15 minutes.

(*) Nous remercions l'Institut Mérieux d'avoir mis à notre disposition ces résidus placentaires provenant de la fabrication des immunoglobulines.

- A l'issue de celui-ci, le mélange est porté une heure à 100°, afin de dénaturer l'enzyme et de coaguler les protéines.

- Filtration sur Buchner, à l'aide de filtre Seitz de porosité déterminée.

- Répartition du filtrat encore chaud, qui est porté immédiatement au lyophilisateur.

Cette technique, longue, puisqu'elle demande une journée entière, et fastidieuse en raison du nombre de manipulations qu'elle exige, nous parait convenir aux buts fixés, malgré ses défauts : absence d'une stricte régulation du pH et de la température, ainsi que d'une agitation suffisante, mais simplicité de mise au point et réduction des contaminations au minimum.

N° des lots	Température	p H	Papaïne %	Temps (heures)	Résidu humide g	Rendement g/100g	Rendement g/l	Azote aminé %	p H final	Quantité d'eau ml
1	55	6,5	0,4	3	74	17,2	78	4,06	6,5	200
2	55	7	0,4	3	91	15,4	65	3,98	6,5	200
3	55	7,5	0,4	3	83	14,8	58	3,94	6,6	200
4	55	8	0,4	3	90,6	13,8	52	3,94	6,6	200
5	60	7	0,4	1	91	15,2	62	3,42	6,5	200
6	60	7	0,4	2	82,3	15,5	65	3,70	6,6	200
7	60	7	0,4	3	74,2	16,6	68	3,84	6,6	200
8	60	7	0,4	4	68,8	18,2	73	4,01	6,5	200
9	65	7	0	3	95,2	3,2	25	2,14	6,9	200
10	65	7	0,2	3	97,5	12,3	65	3,48	6,5	200
11	65	7	0,4	3	99	15,5	72	4,10	6,5	200
12	65	7	0,6	3	91,2	18	74	4,26	6,5	200
13	75	7	0,4	3	96,2	10,2	44	3,74	6,5	400
14	75	7	0,4	3	98	18	48	3,64	6,5	300
15	75	7	0,4	3	104,8	16,7	65	3,74	6,6	200
16	75	7	0,4	3	106,5	17,9	72	3,95	6,4	100

Influence des différents paramètres sur la production de peptone placentaire.
- (Tableau III) -

1.3. ESSAIS DES 16 LOTS DE FABRICATION.

Examinons les indications fournies par les 16 lots lyophilisés obtenus.

1.3.1. Essais physico-chimiques.

- Solubilité : totale et immédiate à 10 p. 100 dans l'eau distillée.
- Humidité : inférieure à 4 p. 100.
- Protéoses : essai à l'acide nitrique positif dans tous les cas, mais absence de précipitation après autoclavage à 110°, pendant 20 minutes.
- Azote aminé : compris entre 2,4 et 4,2 p. 100, donc taux toujours élevé lorsqu'on le détermine par la méthode potentiométrique de la Pharmacopée française.
- pH : voisin de 6,5, sauf pour les lots préparés avec variation de ce paramètre.
- Rendements : compris entre 3,2 et 19,6 g pour 100 g de résidu placentaire sec, à une concentration de la solution mère variant entre 25 et 78 g/l.

Ces résultats sont traduits dans le tableau (III).

1.3.2. Essais microbiologiques.

- Pousse toujours positive en solution à 2 p. 100 avec les germes exigés par la Pharmacopée des U.S.A. pour les peptones bactériologiques (124).
- Détermination de la valeur nutritive en eau peptonée salée ensemencée avec St. aureus (souche London) par mesure photométrique au photomètre Lumétron à 420 nm. (Le détail de cette technique sera exposée au prochain chapitre).

1.4. RESULTATS ET COMMENTAIRES.

On a traduit sur 5 séries de courbes les variations du pouvoir nutritif des lots à l'égard du germe test, parallèlement aux rendements obtenus en grammes par litre de la solution mère et en grammes de produit lyophilisé (pour 100 grammes de résidu sec) (graphiques 1 à 5).

On suivra le plan utilisé dans l'exposé théorique, en examinant successivement l'influence du substrat, de l'enzyme, les conditions de l'hydrolyse, ainsi que les traitements postérieurs à la digestion.

1.4.1. *Influence du substrat.*

Nous avions craint que le résidu placentaire ait été altéré par les opérations de préparation.

En effet, après avoir été congelé à - 25° depuis le moment de la délivrance, celui-ci est décongelé et dilacéré en présence d'un adjuvant de broyage - la cellulose - puis extrait par l'eau physiologique et l'alcool. Le résidu séparé du filtrat a donc subi une certaine dénaturation.

Il apparait, en fait, que cette matière de départ est, dans une certaine mesure, protégée de la putréfaction par le reliquat d'alcool et son humidité assez faible, mais qu'elle est très sensible à l'oxydation, même au réfrigérateur.

Il sera donc nécessaire :

- de stocker, s'il est besoin, cette matière première, en la recongélant et en la conservant à l'abri de l'air (ou sous plastique) et de la lumière.

- de la décongeler juste avant la préparation.

- de rejeter tout résidu ayant des caractères organoleptiques douteux.

En effet, et nous l'avons appris à nos dépens, une matière de base mal conservée conduit à un filtrat colloïdal, très difficilement filtrable, coagulable à des températures plus élevées qu'à la normale, et chargé en pigments.

Lors de notre préparation, on procède, exterporanément, à un nouveau broyage, afin de proposer à l'enzyme un substrat très divisé et d'éviter que les filaments résiduels ne s'enroulent autour des pales de l'agitateur, rendant cette opération inefficace.

1.4.2. Influence de l'enzyme.

Deux points étaient à considérer : la qualité, c'est-à-dire le pouvoir protéolytique de l'enzyme, et la quantité minimum nécessaire à la préparation, c'est-à-dire la concentration de l'enzyme.

1.4.2.1. Qualité.

1.4.2.1.1. Généralités.

Il existe, sur le marché, de nombreuses préparations commerciales de papaïne, toutes différentes en raison des techniques de purification. Il importait donc de définir les méthodes conduisant au choix de l'enzyme, par la comparaison de papaïnes commerciales.

On peut s'adresser à trois groupes de méthodes, pour déterminer l'activité protéolytique de la papaïne :

- Pouvoir de coagulation du lait : l'unité de papaïne est définie comme étant la quantité nécessaire pour coaguler 25 cm3 de lait à 40° en une minute. C'est la méthode de Balls et Hoover (73) pratique et rapide, et cependant peu employée.

- Quantité d'acides aminés libérés : estimée par dosage d'azote aminé, après digestion de la matière protéique - caséine, albumine, gélatine, etc... On a retenu cette technique en opérant sur la gélatine, en nous conformant à un travail antérieur(28

- Quantité de protéines digérées : cette méthode consiste à peser le filtrat obtenu, après digestion de fibrine de porc standard désséchée. C'est la technique adoptée par la Pharmacopée française de 1939 (122), auquel nous nous sommes référés. La papaïne a, depuis cette date, été retirée de la Pharmacopée, ce qui est regrettable, d'autant plus l'imprécision de ce dosage aurait dû faire rechercher un procédé plus adapté. Nous l'avons, néanmoins, retenu dans nos essais.

1.4.2.1.2. Essai de la papaïne.

Deux papaïnes choisies ont été comparées.

- Papaïne n° 1 - Laboratoires Coopérative pharmaceutique française. Lot 505-186.
- Papaïne n° 2 - Laboratoires Biokar. Lot 2622.

a) Formol titration sur gélatine (103) (28).

On a pratiqué ainsi l'essai :

- solution de gélatine à 10 p. 100	20 ml
- solution de papaïne à 10 p. 100	2 ml
- eau distillée	20 ml

Digestion pendant 45 mn, au bain-marie, à 60°, puis filtration.

Titration sur 10 ml de filtrat par NaOH N/10.

Résultats :

- Papaïne n° 1 : ml de NaOH N/10 : 4 ; 3,9 ; 4,4

m = 4,1 x 0,14 = 0,574 g/l d'acides aminés libérés.

- Papaïne n° 2 : ml de NaOH N/10 : 5,7 ; 5,9 ; 5,9

m = 5,85 x 0,14 = 0,819 g/l d'acides aminés libérés.

Soit une différence d'activité de : 100 - 61,0 = 39 %

b) Méthode de la pharmacopée de 1939.

La fibrine de porc pour essais nous a été adressée par le Laboratoire National de la Santé Publique.

On a respecté les normes de l'essai dans les conditions suivantes :

- Papaïne poudre 0,015 g
- Fibrine de porc désséchée 2,5 g
- Eau distillée 50 ml

Digestion pendant 2 heures au bain-marie à 70°, avec agitation toutes les 10 minutes.

On filtre et on détermine l'extrait sec sur 10 ml.

Résultats :

- Papaïne n° 1 : 0,12 g ; 0,19 g ; 0,15 g — moyenne 0,153 g de protéines digérées.
- Papaïne n° 2 : 0,26 g ; 0,20 g ; 0,22 g — moyenne 0,226 g de protéines digérées.

Soit une différence d'activité de : 100 - 67,6 % = 32,4 %

Constatons d'abord que le titre exigé par la Pharmacopée française - au moins 0,30 g d'extrait sec de fibrine protéolysée - n'est jamais atteint, ce qu'ont observé, d'ailleurs, les auteurs qui se sont penchés sur le problème (60).

Soulignons, ensuite, qu'il existe de grandes différences d'action selon le produit auquel on s'adresse, mais que le prix - déjà élevé - de l'enzyme est la rançon versée pour l'obtention d'une plus grande pureté. Industriellement, il serait donc nécessaire de mettre en parallèle coût et activité, avant de choisir la préparation papaïnique à utiliser.

Enfin, il faut insister sur la conservation de l'enzyme et son altération rapide dans de mauvaises conditions. Il sera donc nécessaire de le stocker à basse température, de préparer sa solution extemporanément à partir de la poudre, (ou d'utiliser des solutions maintenues à 4° additionnées d'un conservateur) et d'étudier éventuellement les possibilités de potentialiser son action par un agent réducteur (28).

1.4.2.2. Quantité.

Plusieurs concentrations d'enzyme ont été testées, à commencer par un témoin sans papaïne (Graphique n° 1) ; on peut observer une influence :

- Sur le rendement : la concentration en grammes de peptone pour 100 grammes de résidu sec augmente considérablement, puisqu'on passe de 3,2 g%, en l'absence de papaïne à 12 g% pour 0,2 %, et à près de 18 g% pour 0,4 %. Notons qu'elle n'augmente que faiblement au-delà de cette valeur, et qu'un taux plus élevé reviendrait, sans doute, à un gaspillage de cet enzyme coûteux.

- Sur l'azote aminé : corrélativement, on observe une montée de l'azote aminé, de 3,1 % à 5,2 %.

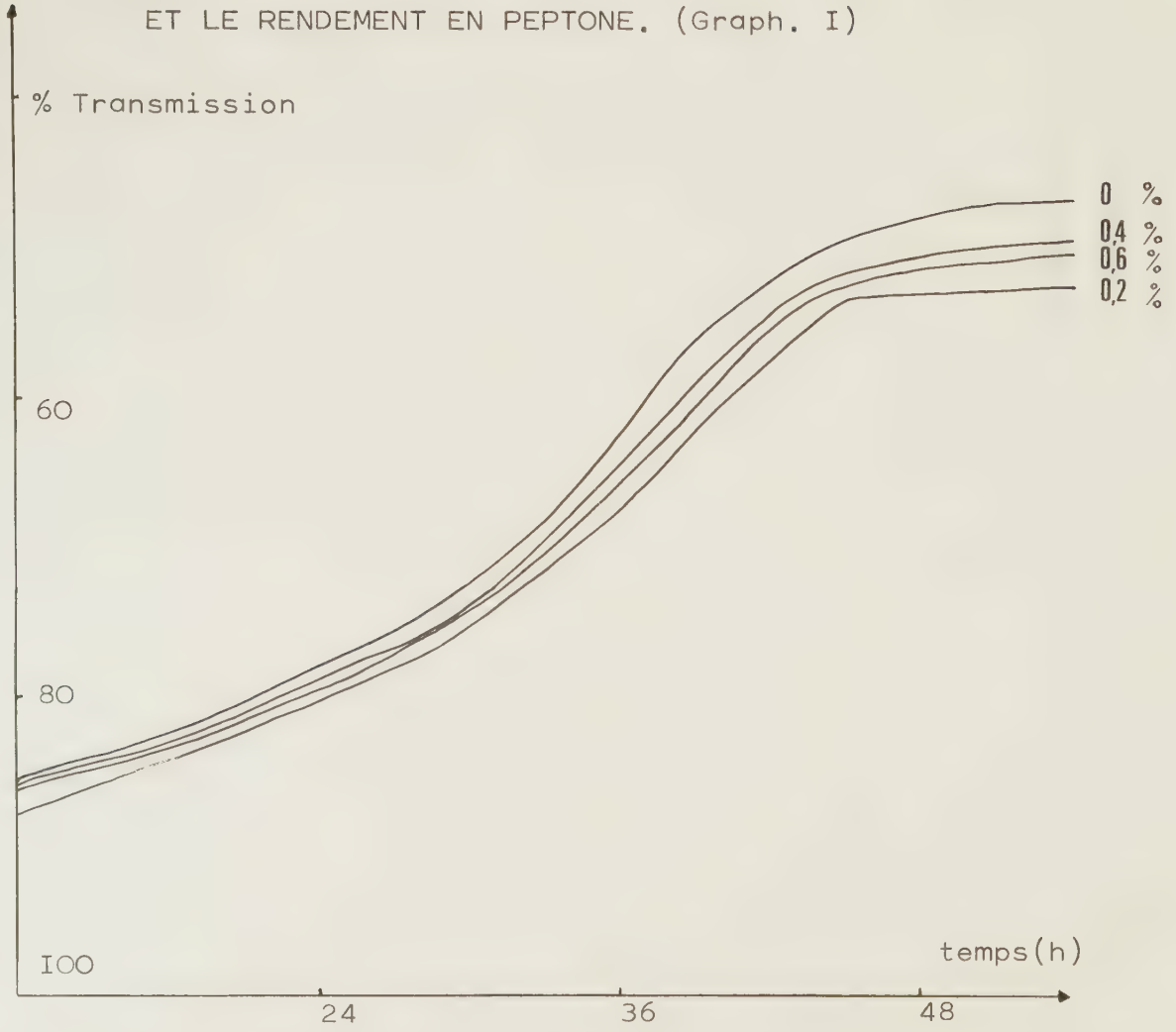
- Sur la pousse microbienne : ici, nous attendait une surprise importante, puisque c'est le lot non papaïné qui nous a donné la plus forte croissance. Les concentrations semblent avoir peu d'effet sur la pousse.

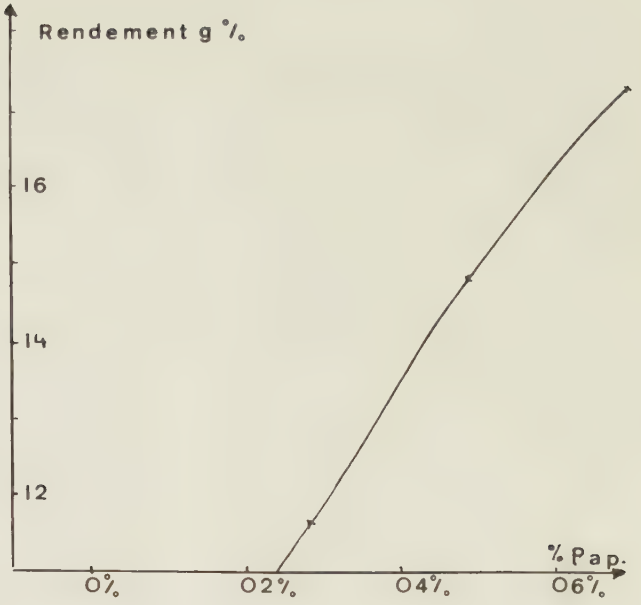
Cependant, des expériences menées à des concentrations élevées (de 1 à 3 % de papaïne) ont montré même une certaine action inhibitrice sur la courbe de croissance, lorsque la concentration augmentait.

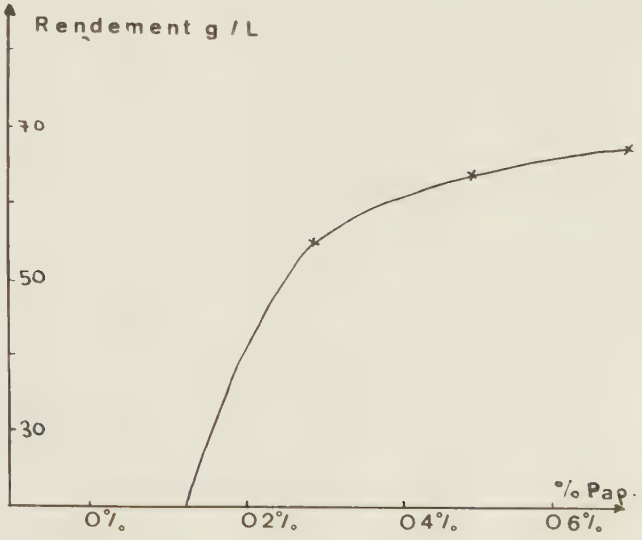
INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PAPAINE

SUR LA CROISSANCE DE ST. AUREUS IOI

ET LE RENDEMENT EN PEPTONE. (Graph. I)







Les conclusions de cette étude sont très importantes :

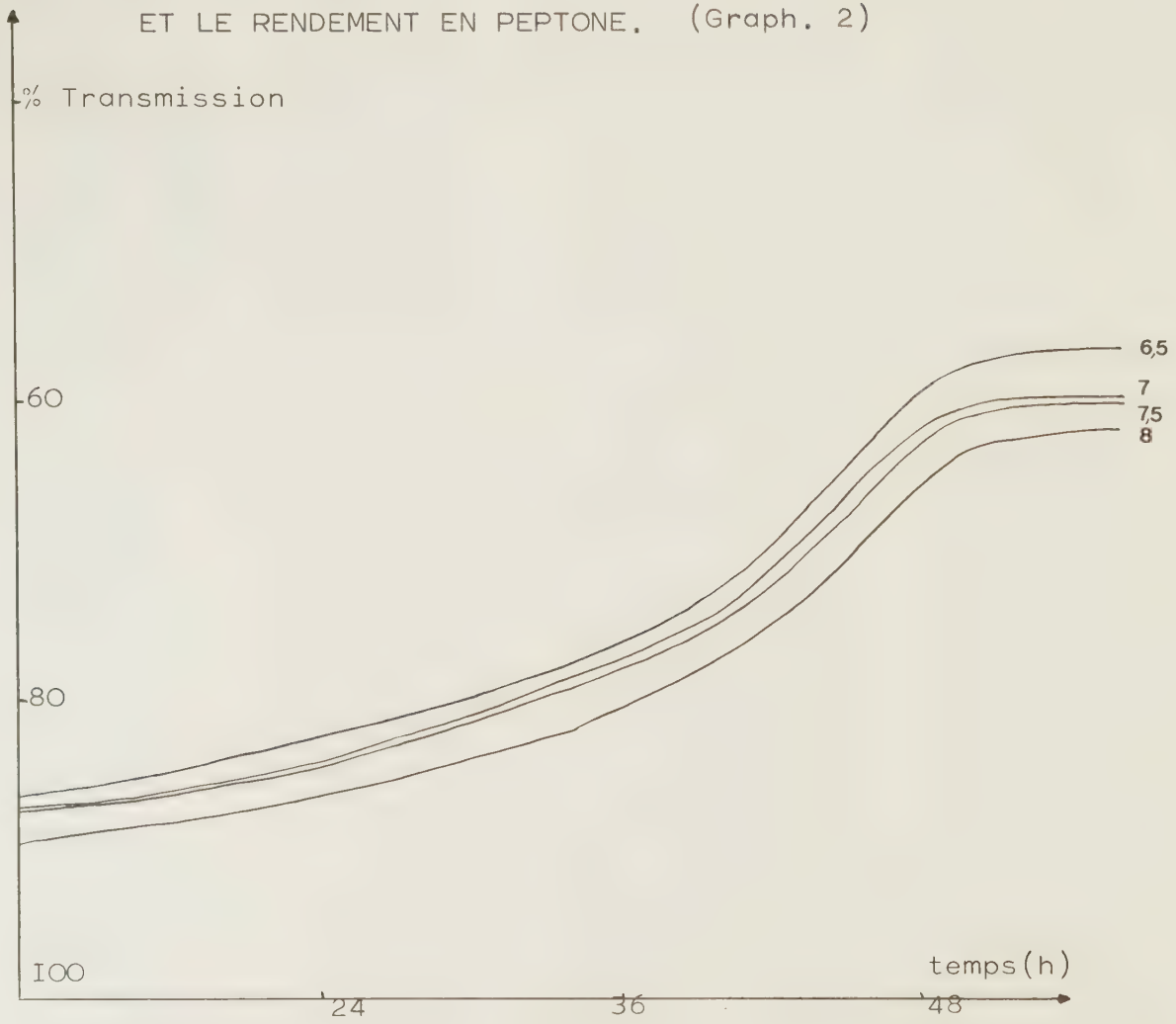
- Il apparait que la valeur nutritive de la peptone ne semble pas due à l'activité particulière de l'enzyme, mais que celle-ci augmente considérablement le rendement de l'opération. Cependant, l'action spécifique de la papaïne peut expliquer certains éléments de l'analyse chromatographique, tels que la teneur élevée en méthionine.

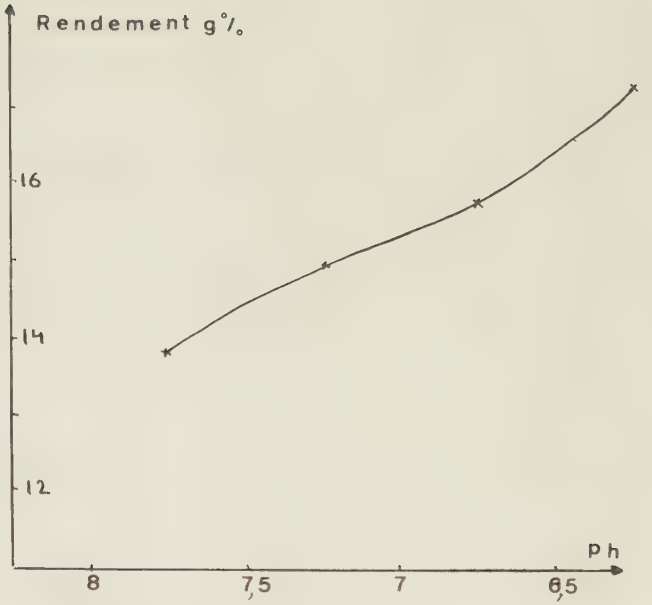
- Il apparait également, point capital, que le taux d'azote aminé n'est nullement significatif de la valeur de la peptone, alors que la plupart des auteurs s'accordent à établir une corrélation azote aminé - pousse microbienne. Ceci sera d'ailleur confirmé dans les autres essais.
Il est vrai que ce taux a été déterminé, par une méthode particulière, celle de la Pharmacopée Française, qui, nous le verrons, n'est pas extrêmement spécifique.

INFLUENCE DU PH DE DIGESTION

SUR LA CROISSANCE DE ST. AUREUS IOI

ET LE RENDEMENT EN PEPTONE. (Graph. 2)





1.4.3. *Influence des conditions opératoires.*

Cinq facteurs sont à considérer :

1.4.3.1. *Le pH.*

Les auteurs le situent, pour les préparations papaïniques de viande autour de la neutralité (88) (139). Nous avons étudié des valeurs voisines, de 6,5 à 8 (graphique n° 2).

Son influence est assez faible, tant sur la pousse que sur le rendement et l'azote aminé. Pourtant, tous ces éléments montrent qu'une alcalinisation est préjudiciable au produit final, et qu'une valeur de 6,5 à 7 permettra d'obtenir le meilleur rendement et la meilleure pousse.

De toute façon, le pH varie très peu au cours de la préparation, puisqu'un lot qui n'a pas subi d'ajustement de pH garde une valeur à peu près constante au cours du temps, voisine de 6,5 - donc un effet tampon très important, sans doute dû au fort taux de protéines du milieu -.

Cette valeur de pH évite, d'ailleurs, une addition massive de soude en fin d'opération, comme c'est le cas pour les peptones pepsiques et les hydrolysats acides, addition qui augmente considérablement le taux de chlorure de sodium ; or, il est bien connu que l'halophilie des bactéries varie dans des proportions assez strictes, et que leur tolérance est très limitée.

Ajoutons que Benoist (11) a noté que les électrodes en verre étaient rapidement polarisées dans une solution de peptone, entrainant une erreur de quelques dixièmes de pH. Il serait donc préférable d'utiliser d'autres électrodes.

1.4.3.2. *La température.*

Les résultats obtenus ont été plus probants, puisqu'on note une augmentation de la valeur nutritive et du rendement

en peptone, lorsqu'on augmente la température ; ceci apparait surtout sur la plus haute valeur testée, c'est-à-dire 75°. (Graphique n° 3).

Il est possible qu'une température un peu plus élevée donne des résultats encore supérieurs. Cependant, on a craint, dans les conditions opératoires, c'est-à-dire en l'absence de régulation thermique, que soit atteinte la température critique d'inactivation de la papaïne (83° C.).

A noter la très grande intetie thermique de ce mélange très épais, très long à faire monter en température.

1.4.3.3. Le temps.

Il était logique d'observer une augmentation de rendement au cours du temps. Remarquons que la concentration atteint un taux élevé au bout d'une heure de digestion, et qu'une hydrolyse prolongée parait augmenter notablement la valeur nutritive. (Graphique n° 4).

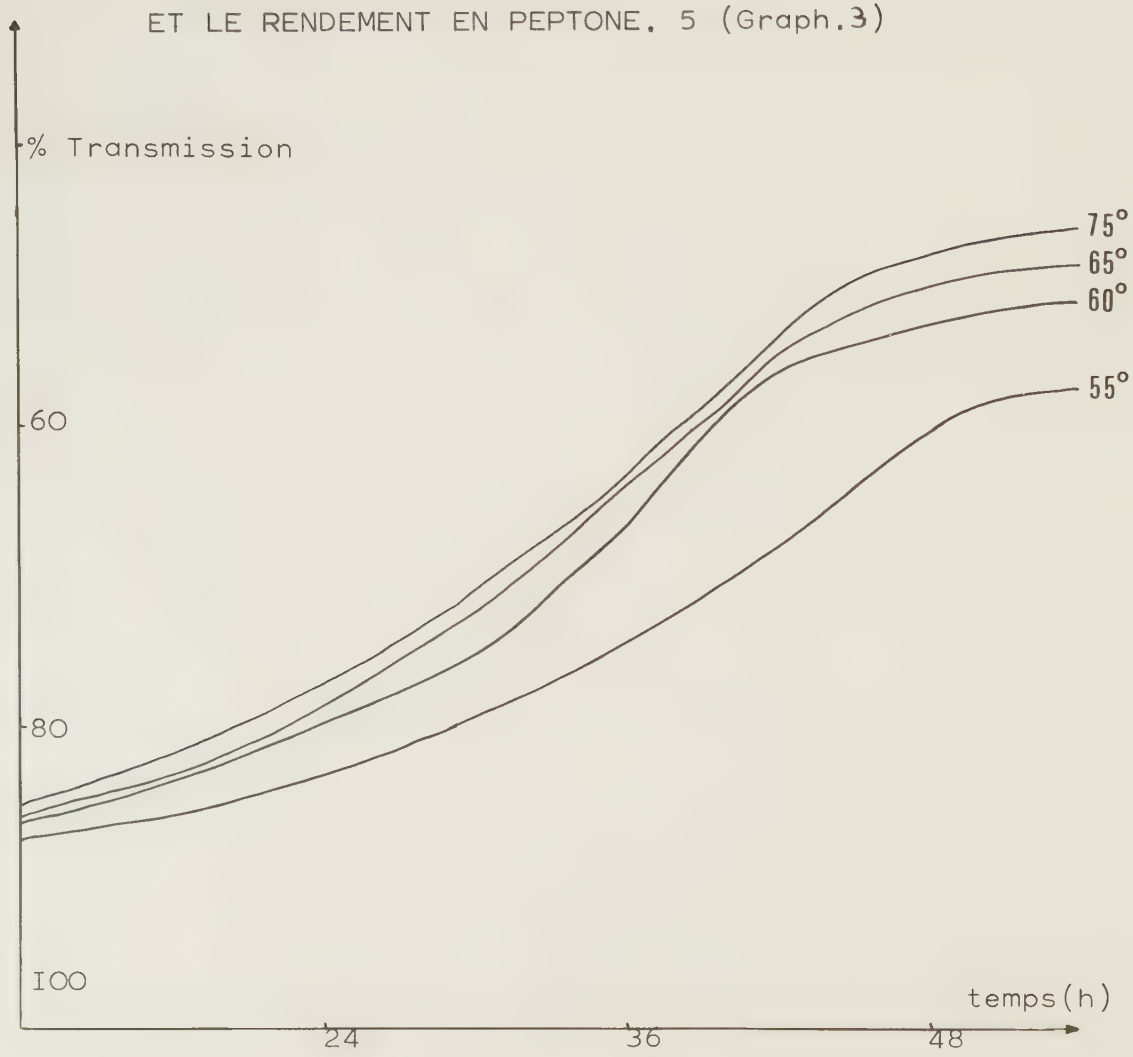
L'appareillage et la longueur de la préparation ne nous permettaient pas de tester des temps supérieurs.

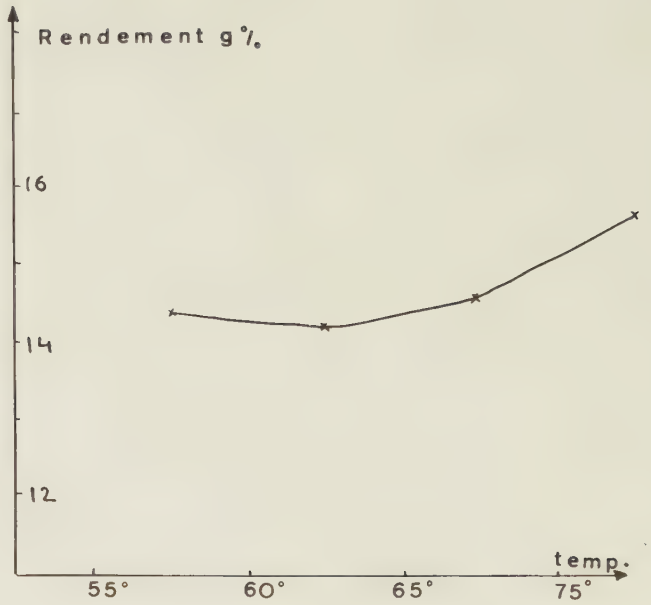
Industriellement, ceci sera fonction du rendement que l'on désire obtenir, et de facteurs extérieurs, tels que la durée de la journée de travail ou le coût de l'opération.

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE DIGESTION

SUR LA CROISSANCE DE ST. AUREUS IOI

ET LE RENDEMENT EN PEPTONE. 5 (Graph.3)

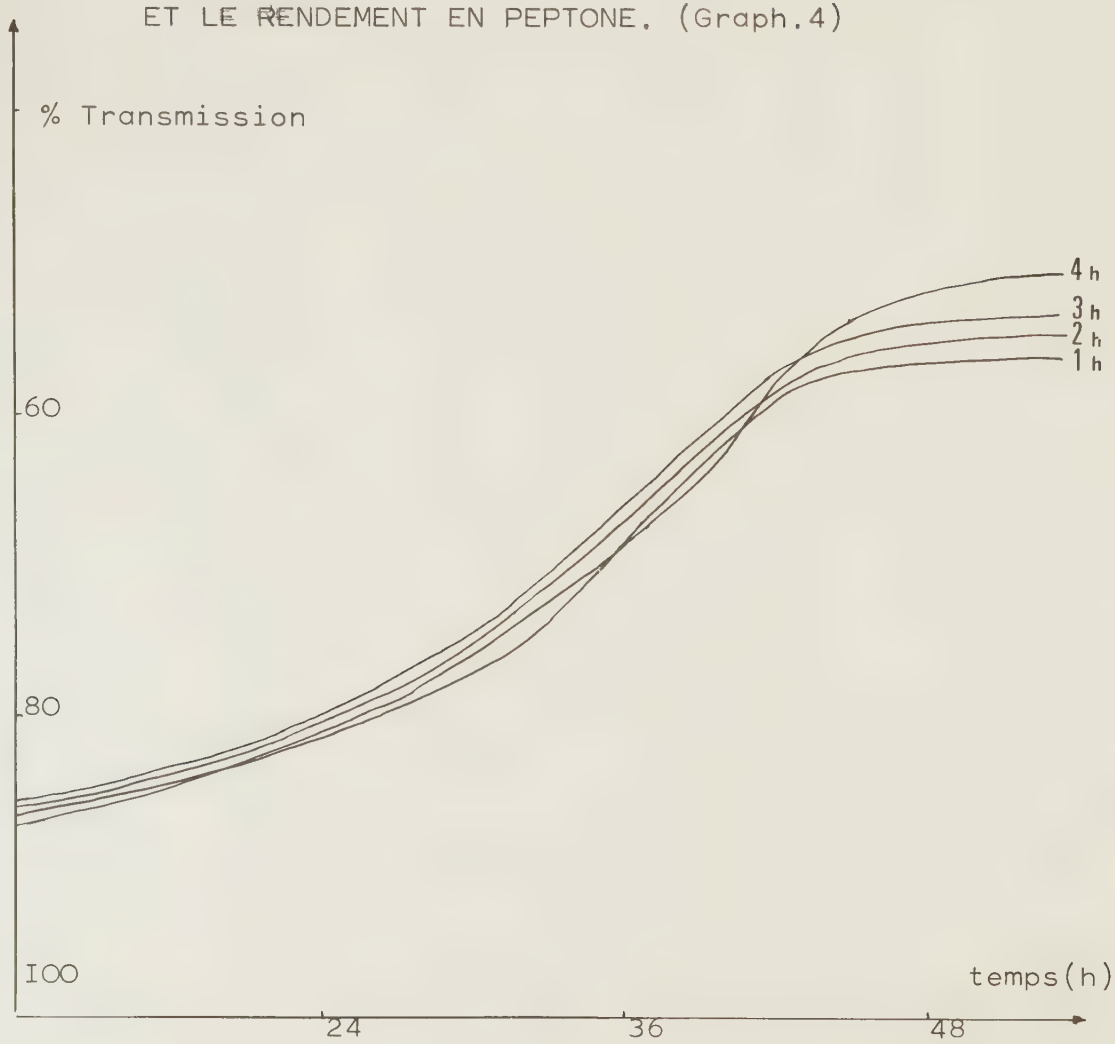


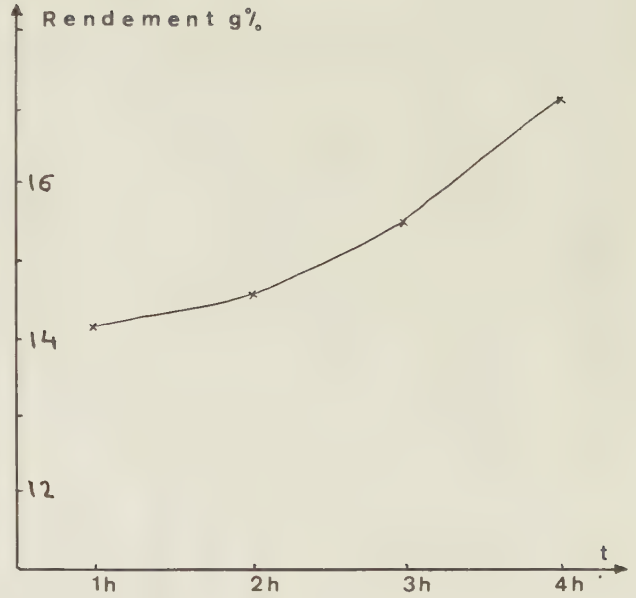


INFLUENCE DE LA DUREE DE DIGESTION

SUR LA CROISSANCE DE ST. AUREUS IOI

ET LE RENDEMENT EN PEPTONE. (Graph.4)





1.4.3.4. Quantité d'eau.

Problème important, puisqu'il va s'agir d'obtenir une concentration maximum de peptone dans le minimum de liquide, de façon à réduire le temps nécessaire à la lyophilisation. On a donc additionné à la matière première une, deux, trois et quatre fois son poids d'eau. Logiquement, nous avons obtenu une augmentation de la concentration, lorsqu'on diminuait la quantité d'eau, assortie d'une baisse du rendement global, tandis que l'azote aminé restait stable. (Graphique n° 5).

Mais, fait plus surprenant parce qu'inexpliqué, la valeur nutritive augmente de manière indiscutable avec la quantité d'eau. On a donc choisi cependant une valeur moyenne de 200 ml d'eau pour 100 grammes de résidu frais afin de limiter le temps de dessication, opération longue et coûteuse, et d'obtenir un rendement satisfaisant: C'est, de plus, la quantité minimum nécessaire pour hydrater totalement notre substrat, sans qu'il y ait apparition d'un surnageant.

1.4.3.5. Agitation.

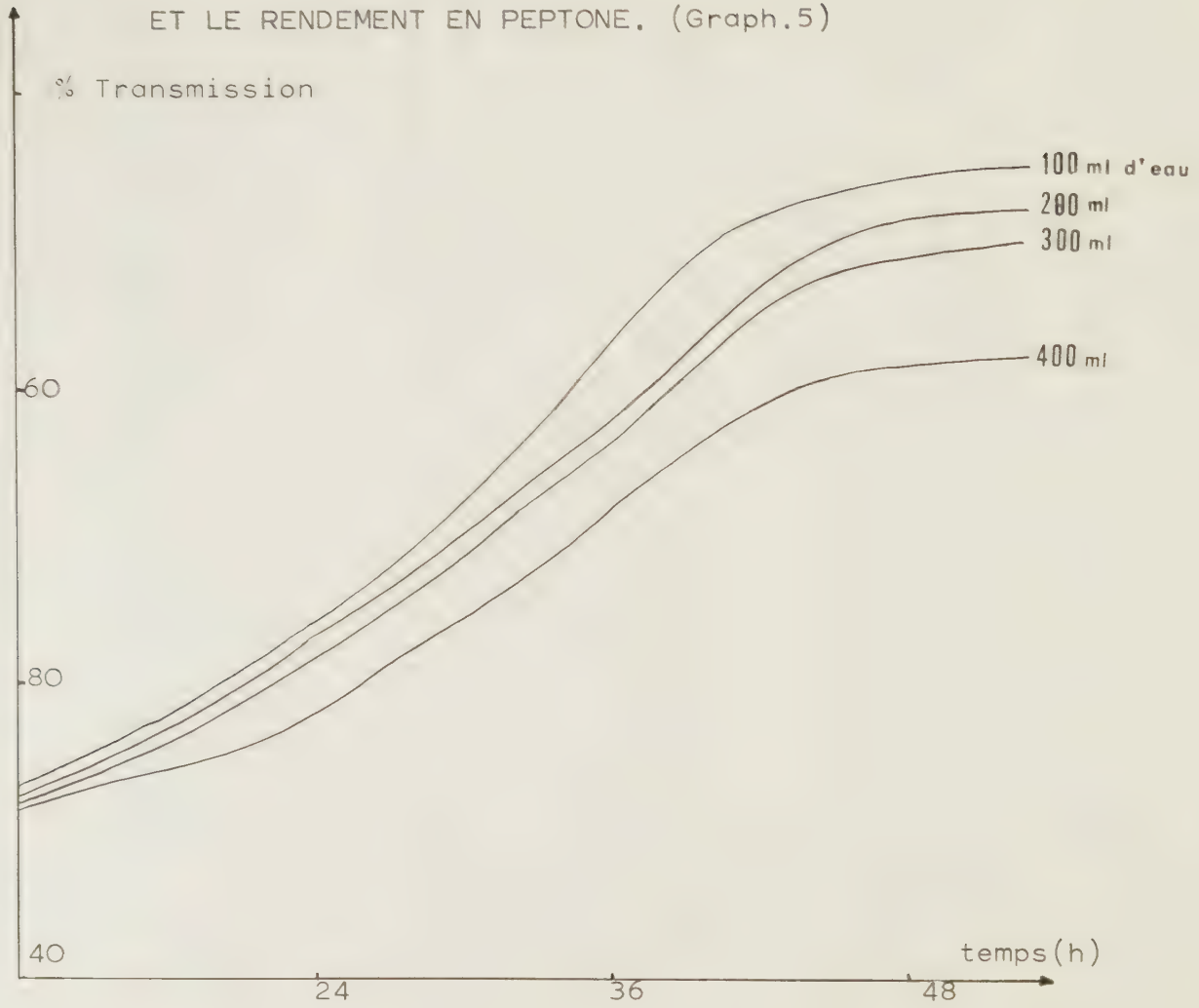
Elle joue un très grand rôle, surtout, comme c'est le cas, lorsqu'on utilise une sonde thermique interne, qui permet une montée de la température bien plus rapide qu'avec un bain-marie (et permet une augmentation du rendement, comme on le verra) mais qui provoque, lorsque la préparation globale atteint 75°, une ébullition autour de son axe. Il est donc nécessaire d'homogénéiser très énergiquement. Lors d'une réalisation industrielle, il y aurait lieu de prévoir des agitateurs à pales extrêmement puissants, vu la résistance de ce milieu très épais.

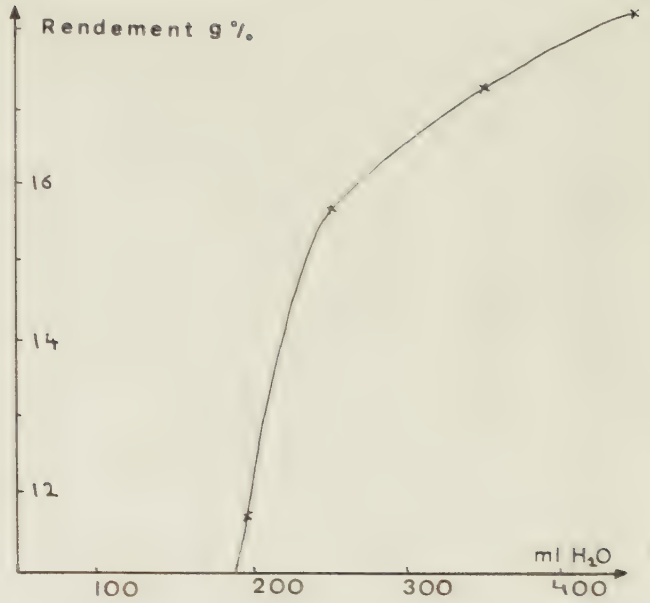
Il sera nécessaire d'éviter les tourbillons et de réduire au minimum le volume d'air présent, en raison de la sensibilité de la papaïne à l'oxydation.

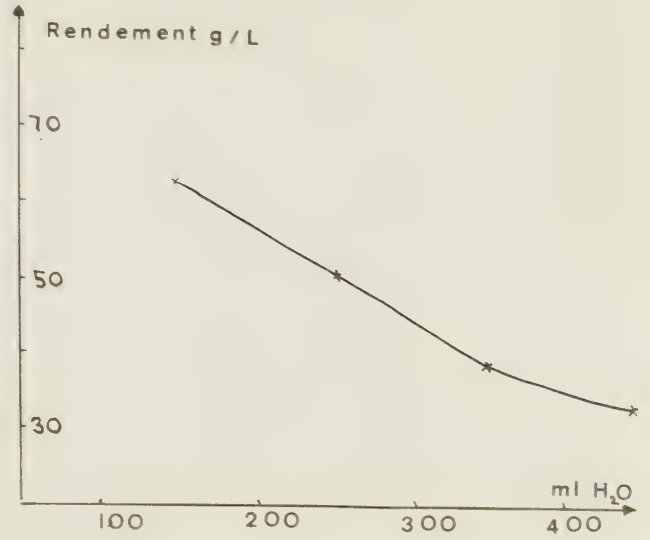
INFLUENCE DE LA DILUTION DU SUBSTRAT

SUR LA CROISSANCE DE ST. AUREUS IOI

ET LE RENDEMENT EN PEPTONE. (Graph.5)







1.4.4. *Influence des traitements postérieurs.*

1.4.4.1. *Filtration.*

Pour les 16 lots d'étude, on a utilisé la filtration sur Buchnër sous vide, d'abord sur papier Joseph pour éliminer la plus grande partie du sédiment, puis sur filtre Seitz C 7 pour purifier la peptone. Ce procédé est lent et incomplet, puisque le rendement que l'on a calculé dépend aussi des capacités de filtration : le résidu reste très humide et provoque une perte importante de peptone.

On avait choisi, arbitrairement, d'arrêter la filtration lorsqu'on obtenait moins d'une goutte à la seconde, procédé empirique qui n'a évidemment pas grande valeur ; la lyophilisation du résidu a montré qu'il contenait encore deux fois son poids d'eau, que l'on n'était pas parvenu à extraire.

Pour les lots préparés en fermenteur de laboratoire, on a utilisé les mêmes filtres, montés sur des cartouches stériles de deux litres, sous pression d'air comprimé, opération plus rapide, réduisant ainsi le temps pendant lequel le liquide est exposé aux contaminations.

Cependant, il s'est avéré que cette filtration posait des problèmes délicats : en effet, l'utilisation d'un filtre trop fin conduit à un colmatage très rapide de celui-ci par une gelée très visqueuse, alors qu'un filtre plus lache, (tel que celui que nous avons dû utiliser) est insuffisant pour assurer une rétention totale de particules de taille importante, riches en mucopolysaccharides, dont nous reparlerons au cours des essais.

Au laboratoire, nous sommes parvenus à éliminer ces impuretés par une ultrafiltration sur appareil Diaflo (M 100), qui permet une agitation constante du liquide pendant l'opération et évite le dépôt du sédiment sur la membrane.

Malheureusement, le rendement horaire de cette opération est faible (400 ml par 24 heures), donc inutilisable pour des volumes importants. De plus, une stérilisation efficace de cet appareil (qui ne supporte pas l'autoclavage) est difficile à réaliser, détail important puisque, bien que cette filtration ait été conduite à + 4°, on a souvent observé des pousses microbiennes abondantes. On peut à la rigueur remédier à cet inconvénient en plaçant le liquide dans des zones de pH incompatibles avec la croissance des microorganismes.

Industriellement, cet écueil pourrait sans doute être aisément franchi par l'utilisation de systèmes de filtration plus puissants, de filtres rotatifs,ou par centrifugation en continu de type Sharpless.

Notons enfin qu'une détérioration de la papaïne conduit à une très mauvaise thermocoagulation, puisque la dégradation est incomplète, et rend toute filtration pratiquement inopérante. Il y a donc lieu, comme nous l'avons déjà souligné, de veiller particulièrement à la conservation de l'enzyme.

1.4.4.2. Autoclavage et contaminations.

1.4.4.2.1. Autoclavage.

Comme on l'a indiqué, la peptone préparée n'est pas stérile, malgré les précautions que nous avons prises au cours de la fabrication, et est notablement contaminée par des Bacillus. Une parfaite stérilité n'est, d'ailleurs, pas nécessaire puisque les peptones du commerce ne le sont jamais, pas plus qu'elles ne sont prélevées stérilement lors de la préparation des milieux de culture. Il est donc nécessaire de les autoclaver classiquement à 110° 20' après leur remise en solution.

Les études que nous avons faites sur des lots autoclavés et non autoclavés nous ont montré une nette diminution du pouvoir nutritif, après cette opération, sur le germe test comme sur les germes exigeants.

Il est évident que l'utilisation d'une température élevée entraine la dénaturation d'une partie importante des facteurs de croissance. C'est la raison pour laquelle nous avons, d'ailleurs, retenu une thermocoagulation à 100°, alors que certains auteurs ne reculent pas devant un chauffage à 121° (114), opération éminemment destructrice.

L'autoclavage à 110° 20' suffit à assurer une destruction totale des formes végétatives et des spores, d'autant plus que Subba (162) a observé qu'une incubation de 30 minutes dans une solution de peptone faisait perdre leur thermorésistance à 90 p. 100 des spores de Bacillus subtilis, Bacillus megaterium et Bacillus licheniformis. De toute façon, nous n'avons jamais observé de sub-culture après incubation à 37° des solutions ainsi traitées.

1.4.4.2.2. Contamination.

Cependant, il est permis de se demander si la présence de débris bactériens après autoclavage n'est pas susceptible de nuire à la valeur de notre préparation, et même des produits commerciaux qui sont, eux aussi, très rapidement contaminés.

Paradoxalement, il semble qu'on observe l'effet contraire d'après Laws (91) : cet auteur a en effet isolé des peptones Oxoïd et Difco des bacilles sporulés, et il a constaté que leur transport dans des milieux faiblement nutritifs autoclavés stimulait la croissance de plusieurs souches d'E. coli, qu'il avait choisi comme germes de référence.

1.4.4.3. Lyophilisation.

Ce procédé a été utilisé avec succès, et ne pose aucun problème particulier si on prend la précaution de n'amorcer le vide que lorsque la température du liquide est descendue en dessous de - 25° C.

On observe un palier de congélation à - 2° et un point de surfusion à - 7°.

Notons l'extrême lenteur de l'opération lorsque la couche à lyophiliser dépasse quelques centimètres. Dans les récipients ronds, on observe, en particulier, la persistance d'un noyau de glace entouré de produit parfaitement sec, noyau qui est très lentement et très difficilement résorbé.

Dans l'industrie, le problème serait assez facilement résolu, en utilisant la dessication sur plateaux, à condition de disposer d'une zone déshumidifiée au sortir de l'appareil.

En l'absence d'un tel dispositif, nous avons fait modifier d'anciens flacons à toxines, afin d'en élargir le col, qui présentent ainsi une surface de contact assez importante et une faible épaisseur de verre. Ceci a diminué de moitié le temps nécessaire à la lyophilisation, par rapport aux flacons classiques de type flacons de transfusion de 500 ml.

A l'actif de ce procédé, notons, bien sûr, la parfaite conservation des qualités du milieu, et la redissolution instantanée de la poudre dans les liquides aqueux.

A son passif, la lenteur et surtout le coût. Une réalisation à grande échelle utiliserait certainement avec profit l'atomisation ou la concentration sous pression réduite, ces deux techniques ayant l'avantage de pouvoir être effectuées à une température non dénaturante pour les protéoses et facteurs de croissance, et d'être aussi beaucoup plus rapides.

La faible teneur en eau de la plupart des produits commerciaux (3 à 4 p. 100) fait soupçonner l'usage de la dessication à basse température.

Ayant ainsi déterminé nos conditions de fabrication et les problèmes techniques soulevés par ces opérations, il était nécessaire de préparer des quantités plus importantes de peptone afin de savoir si ce mode de préparation permettait l'obtention de lots reproductibles à plus grande échelle.

2 - *PRODUCTION DE PEPTONE EN FERMENTEUR DE LABORATOIRE* .

2.1. CHOIX DE L'APPAREILLAGE.

Il s'agissait de réaliser un appareil simple et peu couteux, susceptible de reproduire à une faible échelle la préparation telle qu'elle pourrait se dérouler dans un fermenteur industriel.

Nous avons donc mis au point l'appareil ci-dessous schématisé, comportant (voir page 57) :

2.1.1. *Une régulation thermique* interne, au moyen d'une thermosonde réglée par un thermomètre à contact, selon un procédé de tout ou rien.

2.1.2. *Une agitation* réglable par un rhéostat, mue par un petit moteur.

2.1.3. *Des électrodes* plongeant dans la solution, reliées à un pH-mètre, permettant de suivre l'évolution de l'hydrolyse et de rétablir le pH à la valeur désirée.

2.1.4. *Des tubes* pour prélèvement.

Le tout dans une enceinte de verre pyrex de 5 litres de contenance, fermée par un couvercle inoxydable percé d'orifices adéquats.

2.2. CHOIX DES CONDITIONS OPERATOIRES.

Dans ces conditions, la préparation qui a permis de réaliser des lots définitifs s'est déroulée comme suit, corrélativement aux paramètres que les expériences précédentes nous avaient permis de déterminer :

- décongélation - broyage de 1,5 kg de résidus placentaires.
- mise en solution dans 2,6 litres d'eau distillée.

- addition de 5 grammes de papaïne dissoute dans 100 ml d'eau.
- ajustement du pH à la neutralité.
- incubation trois heures à 75° avec agitation régulière.
- inactivation - coagulation 1 heure à 105° à l'autoclave.
- filtration à chaud sous pression par filtre Seitz C 7.
- répartition dans les fioles à lyophiliser et congélation immédiate.
- lyophilisation après deux heures de congélation (appareillage Virtis).

2.3. *RENDEMENT.*

Il est difficile d'exprimer le rendement global de l'opération, en raison de plusieurs phénomènes :

- l'adjuvant de broyage, la cellulose, n'est pas dégradé , mais est cependant compté dans le poids initial de matière première, le résidu placentaire frais.

- cette matière première, dont le taux d'humidité est variable, perd à la dessication jusqu'à poids constant (à 105°) de 35 à 45 p. 100 de son poids, et de 55 à 65 p. 100 à la lyophilisation.

- enfin, l'absence de moyen industriel de filtration ne permet pas d'exprimer totalement la quantité d'eau chargée en peptone contenue dans le résidu après hydrolyse.

Compte tenu de ces faits, nous avons obtenu un rendement moyen de 75 g/l de filtrat, soit environ 160 grammes de peptone, ce qui représente en pourcentage un rendement de :

10,6 p. 100 par rapport au résidu placentaire frais (humide).

18 p. 100 par rapport au résidu placentaire sec.

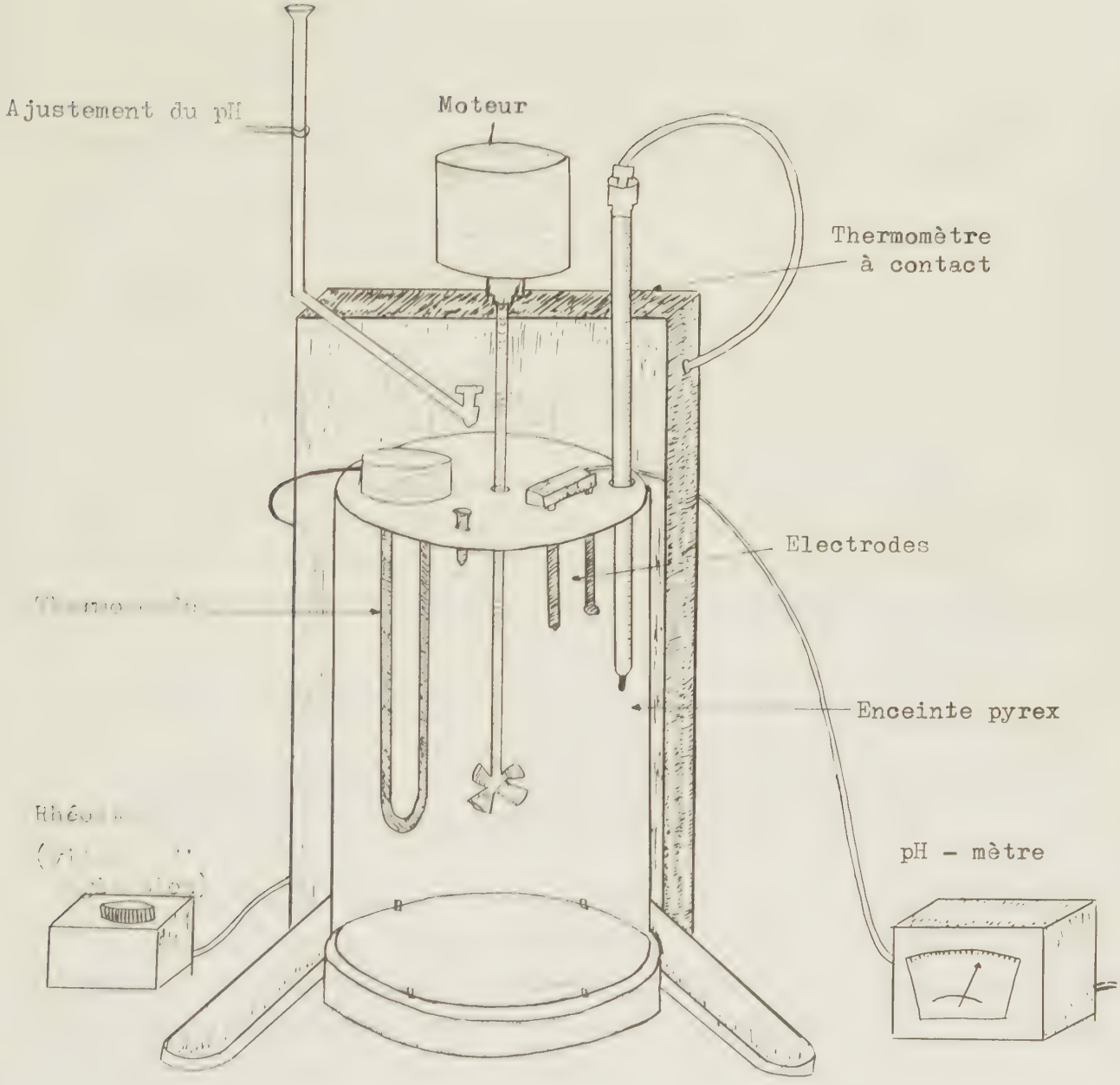
27 p. 100 par rapport au résidu placentaire lyophilisé.

Dans des conditions industrielles, ce rendement pourrait sans doute être considérablement augmenté par lavage et compression du résidu de filtration.

2.4. LOTS DE FABRICATION.

Nous avons retenu pour les études qui vont suivre quatre lots de fabrication, numérotés de 1 à 4 (PP1 à PP4).

Ces lots seront envisagés séparément uniquement pour le dosage des éléments protéiques, afin de déterminer si la préparation est reproductible. Tel n'étant pas le cas, il nous a semblé préférable, pour tous les autres essais - chimiques ou microbiologiques - d'utiliser un lot moyen, constitué par le mélange à parties égales de ces quatre lots de fabrication. (PP1m). Ceci restera valable jusqu'à la fin de ce travail.



SCHEMA DU FERMENTEUR DE LABORATOIRE UTILISE

POUR LA FABRICATION DES PEPTONES .

C - *ESSAIS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA PEPTONE PLACENTAIRE* /

Il convient, maintenant, de soumettre la préparation lyophilisée aux essais destinés à mettre en évidence sa conformité aux normes exigées par les Pharmacopées, et aux normes logiques de la recherche microbiologique à laquelle elle est destinée.

1 - *ESSAIS PHYSIQUES* .

1.1. CARACTERES ORGANOLEPTIQUES.

La peptone se présente sous la forme d'une poudre jaune clair, très hygroscopique, d'odeur faible et de goût assez acre. En solution, son odeur caractéristique suffit à la différencier de toutes les autres peptones commerciales.

1.2. SOLUBILITE.

La préparation lyophilisée en solution à 10 p. 100 dans l'eau distillée est entièrement soluble.

Le liquide obtenu est également jaune clair, ou jaune d'or très vif en solution concentrée : à noter que tout trouble, et surtout toute coloration verdâtre - fait fréquent - doit être considéré comme un vice de préparation, et constitue un excellent moyen de contrôle de la digestion.

1.3. CHALEUR.

Même après autoclavage 30 minutes à 115°, on observe aucune précipitation, aussi bien pour les milieux liquides

que pour les milieux gélosés, ce qui n'est pas le cas de toutes les peptones du commerce, qui présentent souvent de légers troubles, et même des précipités.

1.4. pH.

Les solutions à 1 p. 100 dans l'eau distillée ont des valeurs comprises entre 6 et 6,5, valeurs normales dans les limites admises.

1.5. HUMIDITE.

Mesuré par simple dessication à 110° à l'étuve jusqu'à poids constant, le degré d'hydratation est très variable, allant de 4 p. 100 au sortir du lyophilisateur, jusqu'à 10 p. 100 lorsque le récipient contenant la préparation a été ouvert à plusieurs reprises afin d'opérer des prélèvements. Il convient donc de veiller tout particulièrement au stockage du produit fini.

1.6. CENDRES.

Déterminé par minéralisation au four à moufle à 550° durant trois heures, son taux n'a pas excédé 4 p. 100. Il se situe donc largement à l'intérieur des valeurs admises (moins de 8 p. 100).

2 - ESSAIS CHIMIQUES .

Ces essais sont extrêmement importants, puisqu'ils ont pour but de déterminer :

- Si les lots de peptone placentaire préparés en fermenteur présentent une composition chimique analogue.
- Si cette composition chimique est comparable à celle des peptones commerciales retenues pour notre étude.

- Si, d'un point de vue plus général, la valeur d'une peptone bactériologique peut être déterminée par un - ou plusieurs - dosages chimiques, dosages généralement plus reproductibles et plus rigoureux que la réalisation de courbes de croissance bactériennes.

Nous avons donc testé en parallèle :

- Les quatre lots de peptone placentaire (PP1 à PP4).
- Les cinq peptones commerciales devant nous servir de référence, qui sont :

Protéose-peptone	:	(Difco)
Trypticase	:	(BBL)
Phytone	:	(BBL)
Thiotone	:	(BBL)
Viande-foie	:	(Organotechnie).

Une peptone étant un mélange complexe d'un grand nombre de substances, il était difficile, et certainement peu utile, de procéder au dosage de toutes ces substances. Nous avons donc choisi, après consultation de la bibliographie, de vérifier seulement certains paramètres, et en premier lieu la composition des "peptones" en éléments protéiques.

2.1. DOSAGE DES ELEMENTS PROTEIQUES.

Les techniques de dosage envisageables sont extrêmement nombreuses. On peut classer les techniques utilisées par les auteurs qui ont étudié le problème des peptones en deux catégories :

- Soit le dosage global des éléments protéiques.
- Soit le dosage d'un élément particulier devant servir de référence.

2.1.1. *Dosage global des éléments protéiques.*

Parmi les éléments protéiques, on peut envisager soit le dosage des protéines non entièrement dégradées par les enzymes, soit le dosage de leurs constituants, les acides aminés, libres ou totaux (après hydrolyse chlorhydrique).

2.1.1.1. *Dosage des protéines.*

On a utilisé la réaction du biuret, qui dose le groupement CO-NH à l'intérieur des chaines peptidiques comprenant au moins quatre acides aminés. Nous avons effectué ce dosage à l'aide du réactif de Gornall. Les colorations obtenues avec les différentes peptones sont comparées à celles d'une gamme-étalon, préparée par dilution d'un sérum standard à 64 g/l. La lecture s'opère par photocolorimétrie à 580 nm.

2.1.1.2. *Dosage des acides aminés.*

2.1.1.2.1. *Formol-titration.*

L'action du formol sur les peptones a été étudiée par Lavoille (90) à partir de la technique initiale de Mestrezat (103).

Cette réaction permet le dosage des fonctions acides α aminées des acides aminés après neutralisation de l'acidité libre et bloquage de la fonction aminée par le formol. Ce dosage s'effectue par acidimétrie, soit à l'aide d'un indicateur coloré, soit par potentiométrie, selon la méthode de la Pharmacopée Française, méthode que nous avons utilisée ici (123).

Une formule mentionnée par la Pharmacopée permet de convertir le résultat obtenu en pourcentage d'azote aminé.

En fait, cette réaction dépend essentiellement du caractère plus ou moins acide de la peptone à doser.

2.1.1.2.2. *Réaction à la nihydrine*.

La nihydrine forme, par réaction avec les acides aminés un composé coloré bleu violacé photométrable à 570 nm. Ces acides aminés ont été dosés d'abord d'une manière globale, puis après séparation chromatographique. Ce travail a été effectué dans le service commun de chromatographie de l'Université (Domaine Rockefeller, laboratoire de biochimie pharmaceutique, responsable : Professeur GRAS).

. *Dosage global*.

La technique particulière que nous avons utilisée pour cette réaction était celle de Saifer (145) dans laquelle nous avons remplacé la défécation à chaud par l'acide acétique 0,05 N par une défécation à froid par l'acide trichloracétique à 10 p. 100. Les résultats sont exprimés en mg d'azote aminé par gramme de peptones, puis traduits en mg d'acides aminés libres par gramme (exprimés en glycocolle).

. *Dosage après séparation chromatographique*.

De nombreux auteurs ont étudié cette question ou souligné son intérêt en ce qui concerne, d'une part les peptones - Habeeb (64),Ziska (180), Cassagne (31), Gwyen (63), Lembke (92) - d'autre part les hydrolysats placentaires - Krivoruska (87), Bétail (17), Bondivenne (19), Badinand (5).

Le dosage des acides aminés après séparation par chromatographie sur colonnes a permis d'exprimer la teneur

réelle des peptones en acides aminés, soit à l'état libre, soit libérés par une hydrolyse chlorhydrique.

a) Préparation des échantillons.

. Acides aminés libres.

Une défécation par l'acide trichloracétique à 10 p. 100 a été effectuée.

Pour les peptones Viande-foie, Protéose-peptone, et les lots PP1, PP2, PP3 et PP4, les défécations ont été faites au 1/500e.

Pour la Phytone, la défécation a été faite au 1/250e.

Un léger trouble a été noté sur l'ensemble des préparations. Après centrifugation, l'analyse chromatographique a été réalisée directement sur les surnageants.

. Acides aminés libérés par hydrolyse.

Une hydrolyse acide sous vide a été réalisée sur les solutions de peptones à 1 p. 100 dans NaCl 9 ‰.

0,5 ml de chacune des solutions a été introduite dans une ampoule avec l'acide chlorhydrique sous un volume final de 6 ml et une concentration finale de 6 N et porté à l'étuve à 105° pendant 48 heures.

Au bout de 48 heures, les hydrolysats ont été ajustés à pH 2,2 avec de la soude 6 N.

b) Analyse chromatographique.

Chaque examen a été comparé à des solutions standard d'acides aminés témoins (AA5 standard Amino Acid solution

CALBIOCHEM Réf. 893001, Amino Acid standard physiological A/N et B CALBIOCHEM Réf. 20086 et 20087).

La phase stationnaire était constituée, pour les acides aminés basiques par une colonne de 0,8 x 12 cm de résine AMINEX A5, et pour les acides aminés acides et neutres, par une colonne de 0,8 x 65 cm de résine AMINEX A4.

La phase mobile était constituée par des tampons citrate de sodium aux pH, normalités et températures suivants

pH	4,25	0,35 N	Température 30°)	A.A. basiques
pH	5,28	0,35 N	Température 55°)	
pH	3,23	0,2 N	Température 30°)	A.A. acides et
pH	4,25	0,2 N	Température 55°)	neutres

0,8 ml de chaque solution à analyser ont été injectés après filtration sur filtre millipore 0,22 µ.

Le débit des pompes était le suivant :

tampons..... 0,83 ml/mn
nihydrine..... 0,21 ml/mn
échantillon..... 0,42 ml/mn

Temps de réaction : 7 minutes
Température de réaction: 95°
Vitesse d'enregistrement : 12 cm/heure.

Les mesures photométriques ont été effectuées à deux longueurs d'onde et trois sensibilités :

570 nm..... sensibilité 3
570 nm..... sensibilité 1
440 nm..... sensibilité 3

Réactions	Biuret	Formol titration	Nihydrine			
			Dosage global		Dosage après sépar. chromato.	
Résultats	Protéines mg/g	Azote aminé mg/g	Azote aminé mg/g	Acides aminés+ mg/g	Acides aminés mg/g av. hydrolyse	Acides aminés mg/g ap. hydrolyse
Peptones						
Prot.pep	450	33,8	24,2	129,7	137,74	695,02
Phyt.	360	25,2	15,2	81,5	70,44	550,37
Thiot.	330	44,1	33,1	177,4	262,96	677,27
Trypti.	240	38,7	25,2	135,1	172,01	757,26
Viande Foie	170	30,1	18	96,5	80,93	701,73
PP1	410	34,5	24,4	130,8	147,97	752,06
PP2	470	32,8	19,0	101,8	96,96	749,01
PP3	530	34,0	19,4	104,0	73,92	805,39
PP4	550	33,8	19,6	105,0	67,44	811,58

+ exprimés en glycocolle

DOSAGE DES PROTEINES ET DES ACIDES AMINES CONTENUS DANS LES PEPTONES

- (Tableau IV) -

2.1.1.3. Résultats.

. *Dosage des protéines et des acides aminés contenus dans les peptones.*

Les résultats sont consignés dans le tableau IV :

- Les valeurs obtenues par la réaction du biuret sont comparables entre elles, bien que légèrement plus élevées pour nos préparations que pour les peptones commerciales - indice probable d'une dégradation enzymatique moins poussée -.

- La formol titration fournit également des valeurs en azote aminé assez voisines.

- Par contre, les résultats obtenus en acides aminés libres par la réaction à la nihydrine avant et après séparation chromatographique , ne sont pas tout à fait superposables. Cette différence peut être due, par exemple, au mode d'expression des résultats (exprimé en glycocolle pour le dosage global), ou être due aux conditions opératoires par exemple : la solubilisation des peptones est différente lors du dosage global des acides aminés (milieu aqueux) et lors du dosage après séparation chromatographique (effectué en milieu trichloracétique).

- Enfin, les valeurs obtenues en acides aminés totaux après hydrolyse acide et séparation chromatographique sont très semblables, malgré la différence d'origine des peptones, soulignant l'unité de composition de la matière vivante.

. *Dosage des acides aminés isolés par séparation chromatographique.*

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux V à VIII.

Tableau V

Teneur en acides aminés libres de préparations de peptones.
Résultats exprimés en mg/g de peptones.

	V. Foie	Prot. Pept.	PP1	PP2	PP3	PP4
ORN	2,24					
LYS	4,36	4,38	12,53	7,96	7,19	5,57
HIS	2,05	2,02	2,71	1,57	1,65	1,21
ARG	Traces	4,68	15,15	10,02	9,38	5,71
TAU	2,05	3,24	Traces	0,81	0,99	1,03
ASP	mal	7,67	5,56	3,17	2,22	1,87
THR	séparés	6,25	5,49	3,19	2,26	1,72
SER	3,58	5,26	7,40	4,75	3,46	2,82
GLN + ASN	Traces	4,68	9,58	4,95	4,54	4,58
PRO	3,16	3,03	3?87	2,77	Traces	Traces
GLU	6,85	13,08	8,89	4,71	3,62	2,68
GLY	4,27	5,09	10,68	4,77	4,33	4,15
ALA	5,95	9,01	10,44	7,42	5,25	3,39
VAL	4,32	7,17	5,15	3,15	2,00	1,56
CYS					Traces	
MET	6,29	11,07	11,53	8,95	7,80	13,55
ILE	4,36	5,84	7,76	5,52	3,55	1,39
LEU	14,15	24,59	17,36	12,56	9,25	8,79
TYR	5,37	6,07	6,20	4,77	2,57	2,83
PHE	11,93	14,61	7,67	5,92	3,86	4,59
ALA						
Total	80,93	137,74	147,97	96,96	73,92	67,44

Tableau VI

Teneur en acides aminés de préparations de peptones soumises à une hydrolyse de 48 h à 105° par HCl 6 N.

Résultats exprimés en mg/g de peptones.

	V. Foie	Prot. Pept.	PP1	PP2	PP3	PP4
LYS	68,86	55,48	62,89	69,44	66,81	65,14
HIS	21,18	17,36	17,70	18,84	20,73	20,56
ARG	42,12	50,56	53,05	51,72	59,11	60,15
ASP	61,27	27,90	63,44	60,23	69,62	72,39
THR	46,19	45,97	56,99	50,47	49,26	53,35
SER	37,72	33,65	35,65	37,49	39,18	38,86
PRO	38,81	48,47	51,77	46,91	54,13	53,13
GLU	99,08	110,15	102,90	100,42	113,17	111,23
GLY	50,15	74,27	86,17	88,65	90,74	89,63
ALA	49,45	52,87	42,64	49,19	50,54	48,96
VAL	36,83	37,55	38,60	36,32	41,23	41,32
MET	11,92	13,27	12,10	13,27	13,06	11,48
ILE	28,81	26,71	25,54	24,52	26,34	26,71
LEU	51,92	51,63	47,85	49,11	53,97	54,56
TYR	27,78	21,54	28,12	25,82	28,59	27,94
PHE	29,64	27,64	26,25	26,61	28,91	31,07
Total	701,73	695,02	752,06	749,01	805,39	811,58

N. B. La séparation des acides aminés libres a permis de mettre en évidence pour chacune des préparations un pic de cystathionine et d'ammoniaque, dont la valeur n'a pu être appréciée. Dans l'hydrolysat de thiotone, il a été noté la présence d'un pic d'hydroxyproline.

Tableau VII

Tableau VIII

	ACIDES AMINES LIBRES			ACIDES AMINES LIBRES APRES HYDROLYSE		
	Thiot.	Phyt.	Trypt.	Thiot.	Phyt.	Trypt.
ORN		1,76	1,55			
LYS	20,59	4,75	52,32	57,09	43,58	36,78
HIS	4,78	1,22	3,88	15,80	15,08	24,67
ARG	21,68	5,13	28,25	48,90	36,25	29,15
TAU	4,92			Traces		
ASP	10,04	3,48	2,02	50,17	57,86	43,39
THR	8,58	2,52	4,54	31,15	52,14	37,57
SER	10,72	4,30	3,07	28,43	29,11	38,91
GLN + ASN	9,95	6,19	5,87			
PRO	4,04	Traces	Traces	49,29	25,26	80,77
GLU	19,79	5,42	3,72	93,14	118,90	187,91
GLY	9,70	2,17	1,24	84,49	24,89	13,70
ALA	15,50	2,83	3,54	53,91	23,15	26,05
VAL	14,17	1,80	9,15	42,00	24,70	52,55
CYS	4,71		Traces			
MET	15,38	5,10	10,77	10,61	4,43	18,58
ILE	14,47	4,09	8,89	24,19	20,23	41,35
LEU	45,15	10,05	4,12	53,29	34,87	71,47
TYR	7,88	2,36	3,45	6,63	18,05	16,56
PHE	20,91	5,00	22,39	28,18	21,87	37,85
ALA		2,27	3,24			
Total	262,96	70,44	172,01	677,27	550,37	757,26

(Teneur en acides aminés des peptones BBL avant et après hydrolyse.)

Remarquons les variations importantes de composition en acides aminés libres, alors que les taux des acides aminés totaux obtenus après hydrolyse sont extrêmement semblables.

Le taux d'acides aminés libérés par l'hydrolyse acide doit bien entendu être considéré dans le contexte des critères ayant servi à sa détermination : en effet, ces valeurs ont été obtenues après une hydrolyse de 48 heures à 105° en présence d'HCL 6N et sous vide.

Si les valeurs déterminées ne correspondent peut-être pas à la teneur exacte en acides aminés des préparations (compte tenu du rendement de la réaction) par contre, ces valeurs sont directement comparables entre elles. Il est d'ailleurs à noter que, pour les préparations commerciales ayant servi de référence, les valeurs obtenues recoupent assez étroitement celles fournies par les laboratoires fabricants.

Remarquons également que nos lots de fabrication présentent des valeurs inégales dans la composition en acides aminés libres, l'intensité de la digestion papaïnique ayant sans doute été différente au cours de leur préparation.

Cependant, tous ces lots renferment à des taux élevés tous les acides aminés indispensables à la croissance bactérienne, et sont particulièrement riches en lysine, en arginine, en méthionine et, nous allons le voir, en tryptophanne.

2.1.2. *Dosage d'un élément de référence.*

Les méthodes proposées sont toutes basées sur la recherche des acides aminés aromatiques et hétérocycliques :

- Mesnard et Devaux (102) ont utilisé la coloration formée par des acides aminés à fonction phénol libre avec le réactif sulfomolybdique de Folin - Ciocalteu par photocolorimétrie à 580 nm.
D'après ces auteurs, on pourrait ainsi doser la "peptone totale" dans les médicaments. Il va sans dire que cette affirmation nous parait malheureusement, à la lumière des analyses précédentes, illusoire en raison de la variabilité des taux de ces acides aminés dans les différentes peptones.

- Later et Quincy (89), dans un travail réalisé à Lyon, proposent un dosage de la tyrosine et du tryptophanne par une méthode enzymatique, dans le but de réaliser un contrôle de la préparation industrielle des hydrolysats protéiques : ces auteurs estiment, en effet, que ces deux aminoacides "se dégradent si facilement qu'une baisse de leur taux peut être regardée comme le signe d'un vice de préparation ou d'un défaut de conservation".

Argument plus sérieux, qui nous a amené à envisager une méthode de dosage de tryptophanne, d'autant plus que cet acide aminé, en raison de son extrême fragilité, se dégrade au cours des séparations chromatographiques, et que nous n'avions donc pas d'indication quant à son taux.

Nous avons utilisé la technique de Puech et Duru (131) basée sur la coloration violacée spécifique obtenue par la réaction du tryptophanne sur l'acide glyoxylique en milieu acétique et en présence de chlorure ferrique.

La gamme étalon de tryptophanne est réalisée par

dilutions successives dans l'eau distillée à des concentrations variant de 10 à 100 µg sous un volume de 0,5 ml.

La lecture s'effectue par photocolorimétrie à 563 nm par rapport à un blanc réactif.

Résultats :

Peptone	Tryptophanne (mg/g)
PP1	11,7
PP2	9,0
PP3	12,4
PP4	13,5
Protéose-peptone 3	7,6
Trypticase	6,5
Phytone	5,6
Thiotone	4,6
Viande-foie	15,2

Constatons l'extrême richesse de nos préparations en tryptophanne, corrélativement à la réaction microbiologique de l'indole, particulièrement nette, nous le verrons, avec la peptone placentaire. En ce qui concerne les autres préparations commerciales, leur taux correspond sensiblement aux valeurs publiées par les laboratoires fabricants (9).

2.2. DOSAGE PROPRE A LA PEPTONE PLACENTAIRE.

Nous avons souligné lors de la préparation de la peptone que, en l'absence d'un procédé de filtration industriel, nous obtenions un produit chargé en impuretés. Il était donc nécessaire de préciser la qualité et le rôle de ces impuretés, et de rechercher un procédé de contrôle de leur présence.

Les Pharmacopées imposant l'absence de protéines non digérées, nous avons effectué les essais qu'elles prescrivent :

. *Pharmacopée Française*.

Pas de trouble par addition de quelques gouttes d'acide nitrique à la peptone diluée à 10 p. 100 dans l'eau distillée.

. *Pharmacopée des Etats-Unis*.

Pas de trouble par addition de 0,5 ml d'une solution constituée de 1 ml d'acide acétique dans 10 ml d'alcool éthylique, à 1 ml d'une solution de peptone à 10 p. 100.

Dans les deux cas, la réaction a été positive.

On pouvait donc suspecter la présence de protéines non digérées dans les lots de peptones placentaires. Afin de les éliminer, nous avons filtré une solution de peptone à 20 p. 100 sur un filtre Diaflo de type M 100 (rétention de toutes les substances de PM supérieur à 100 000).

Sur la membrane de filtration, on a recueilli un résidu visqueux, filant et translucide. En solution dans l'eau, il a donné à nouveau les réactions précédentes. Le filtrat, par contre, ne se troublait plus, prouvant l'élimination des substances responsables de ces réactions. Cependant, alors que le filtrat présentait des valeurs en protéines pratiquement inchangées lors de la réaction du biuret, le résidu donnait une valeur très faible. Les réactions précédentes n'étaient donc pas dues à des protéines non digérées.

On soupçonna la présence de mucopolysaccharides précipitant en milieu acide : un dosage confirma cette hypothèse.

2.2.1. *Dosage des mucopolysaccharides.*

On a utilisé la méthode de Manuel (99) en pratique à l'Institut Pasteur de Lyon. Elle est basée sur la fixation spécifique d'un colorant, le bleu Alcian, sur les mucopolysaccharides. On dépose sur une bande de papier-filtre 20 µl de peptone à 10 g/l (meilleure sensibilité de la réaction). On fixe une heure à l'étuve à 100°. Puis :

- Immersion des bandes dans un bain éthanol-chloroforme (80/20 v/v pH 7)(15 minutes).

- Après séchage, coloration par le bleu Alcian (1 g % dans une solution acétique - eau (90/10 v/v).

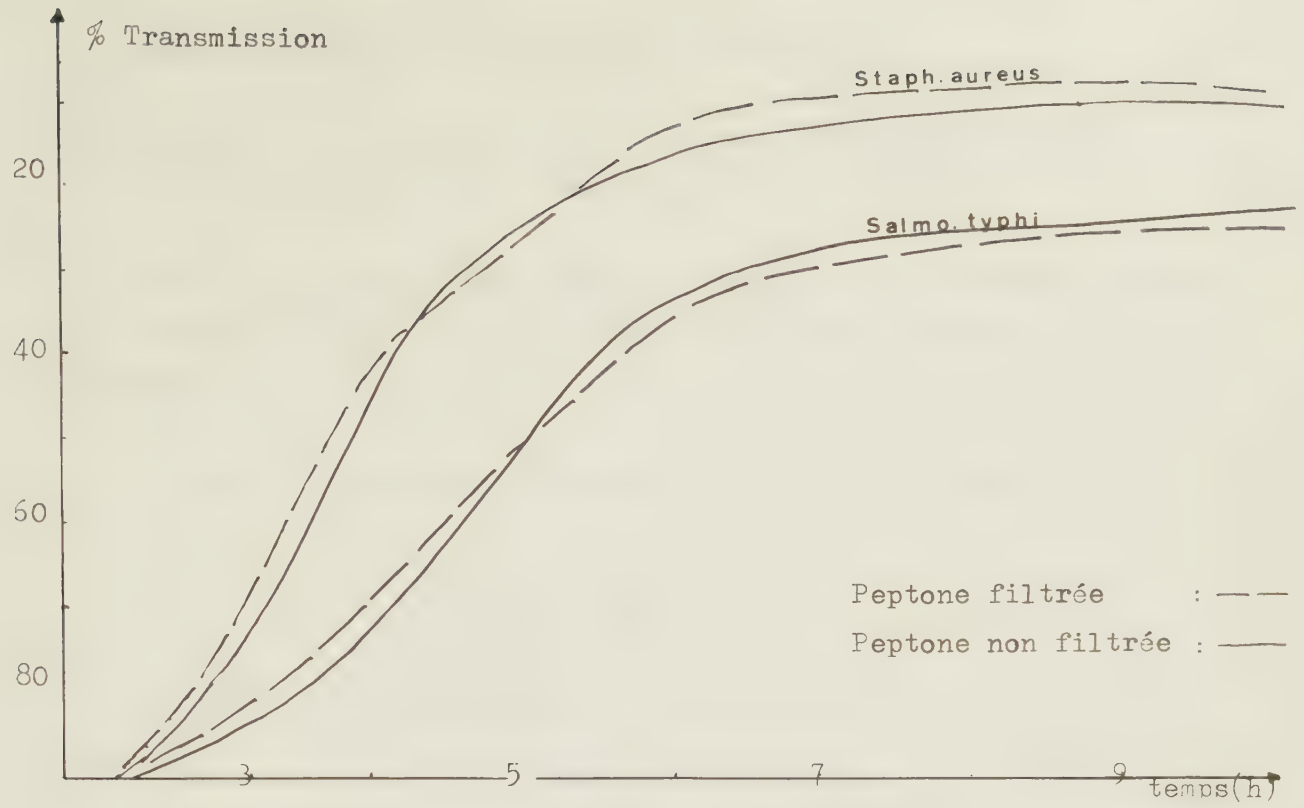
Décoloration par bains successifs d'acide acétique glacial séparés par des lavages à l'eau courante. Les mucopolysaccharides donnent une tache bleue de taille et d'intensité de coloration variables.

La réaction est lue comparativement à un étalon d'acide chondroïtique sulfurique A dilué, de 10 mg % à 10 g %.

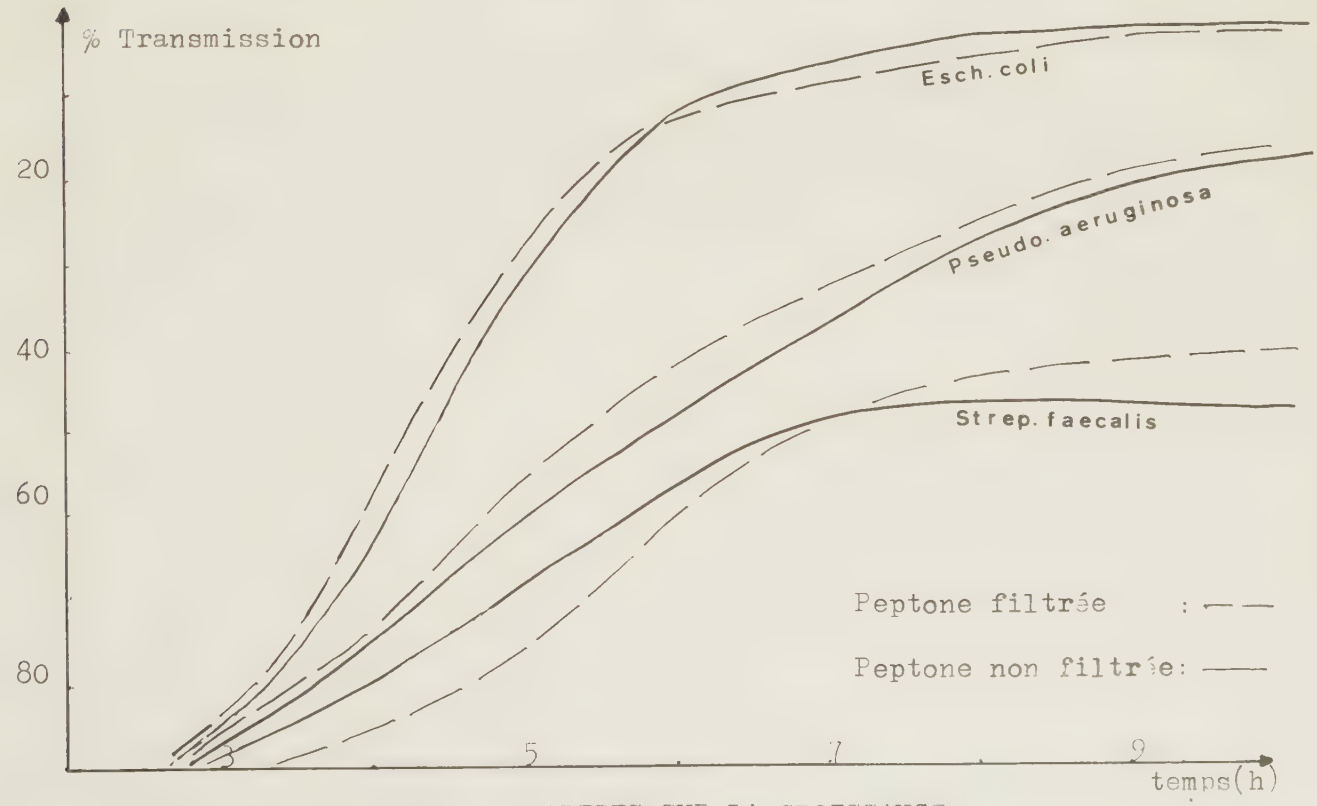
	Peptones avant filtration				Peptones après filtration	Résidu de filtration
Lots	PP1	PP2	PP3	PP4		
Taux de MPS (mg/g)	7-8	7	7-8	10	0,5	300-400

2.2.2. *Rôle des mucopolysaccharides sur la croissance bactérienne.*

Nous avons réalisé des courbes de croissance biophotométriques dans des conditions que nous décrirons en détail dans le prochain chapitre, sur plusieurs germes.



INFLUENCE DES MUCOPOLYSACCHARIDES SUR LA CROISSANCE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ET DE SALMONELLA TYPHI. (Graph. 6)



INFLUENCE DES MUCOPOLYSACCHARIDES SUR LA CROISSANCE DE ESCHERICHIA COLI , PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET STREPTOCOCCUS FAECALIS.

Deux milieux étaient testés parallèlement :

- L'un étant un échantillon moyen de peptone placentaire (lot moyen PPL m) à 1 p. 100 dans l'eau distillée.

- L'autre étant constitué d'une partie du lot précédent, remis en solution, filtré sur Diaflo M 100, puis lyophilisé à nouveau.

A titre d'exemple, comparons les tracés obtenus avec :

Graphique n° 6

(Staphylococcus aureus 101
(Salmonella typhi 948
(Escherichia coli 111B4
(Pseudomonas aeruginosa 725
(Streptococcus faecalis 9

Constatons qu'il n'y a pas de différence sensible dans les courbes, et que le pouvoir nutritif des deux peptones parait constant.

Cependant, dans l'hypothèse d'une fabrication industrielle il serait bon d'éliminer ces mucopolysaccharides, puisqu'ils ne renforcent en aucune manière le pouvoir nutritif de nos préparations.

2.3. ESSAIS CHIMIQUES DES PHARMACOPEES.

Outre la recherche des protéines non digérées, la pharmacopée des Etats-Unis prescrit les recherches suivantes.

2.3.1. Présence de protéoses.

Addition à la peptone diluée à 0,1 p. 100 dans l'eau de 4 ml d'une solution saturée de sulfate de zinc : on observe une précipitation signant la présence normale de protéoses.

2.3.2. Dosage de l'azote total.

Déterminé par la classique méthode de Kjeldahl, nous avons obtenu sur les différents lots de notre préparation une valeur moyenne de 12,1 p. 100, valeur conforme aux normes des pharmacopées (voir tableau I).

2.3.3. Recherche des nitrites.

A 5 ml d'une solution de peptone à 2 p. 100 dans l'eau, on ajoute 0,5 ml de réactif de Griess (α naphtylamine + acide sulfanilique). Après 15 minutes, il ne se développe pas de coloration rouge. Notons d'une part que la peptone placentaire non filtrée a donné une précipitation avec ce réactif, et d'autre part qu'il est nécessaire d'effectuer la réaction par rapport à un témoin d'eau distillée, ce réactif donnant naturellement une faible coloration rose.

2.3.4. Absence d'indole.

A 10 ml d'une solution aqueuse de peptone au 1/100, on ajoute dix gouttes de réactif de Kovacks (solution alcoolique à 5 p. 100 de paradiméthylaminobenzaldéhyde + 3 ml d'HCL concentré + 2 ml d'alcool amylique). On ne doit pas observer de coloration violette. Ces recherches se sont montrées satisfaisantes pour les lots de peptone placentaire.

2.4. DOSAGE DES PRINCIPAUX ELEMENTS APRES MINERALISATION.

Afin de compléter notre étude, il était nécessaire de doser certains constituants de notre préparation de manière à avoir une idée de sa composition globale. Cependant il nous a paru superflu de poursuivre l'étude comparative dans ce domaine.
Les dosages ont donc seulement été effectués sur les lots de peptone placentaire.

On a utilisé les méthodes Technicon, après minéralisation à 550° et remise en suspension des cendres dans l'eau distillée.

2.4.1. Dosage du soufre.

Sous forme de sulfates : les ions SO_4^{--} sont précipités sous forme de $BaSO_4$ en milieu acide par addition de $BaCl_2$.

La mesure est effectuée par turbidimétrie à 525 nm (sensibilité 1 mg/l).

Résultat : Valeur moyenne des lots = 16,75 mg/g de cendres - Rapporté à la peptone totale = 0,97 p. 100

2.4.2. Dosage du phosphore.

Sous forme de phosphates : les ions PO_4^{--} sont dosés par réaction en milieu acide avec le molybdate d'ammonium qui est réduit par l'acide ascorbique. La lecture s'effectué à 660 nm (sensibilité 0,02 mg/l).

Résultat : Valeur moyenne des lots = 96,25 mg/g de cendres - Rapporté à la peptone totale = 0,402 p. 100

2.4.3. *Dosage des chlorures.*

Les ions Cl^- réagissent avec le thiocyanate mercurique pour donner du chlorure mercurique en libérant des ions thiocyanate, qui forment, avec les ions ferriques présents dans le milieu, du thiocyanate ferrique ; la lecture s'effectue à 480 nm (sensibilité 0,5 mg/l).

Résultat : Valeur moyenne des lots = 296,7 mg/g de cendres - Rapporté à la peptone totale = 1,24 p. 100

2.4.4. *Dosage du sodium et du potassium.*

Ces ions sont dosés classiquement par photométrie de flamme.

Résultat : Valeur moyenne des lots :

Na = 413 mg/g de cendres
K = 79,7 mg/g.

Rapporté à la peptone totale : Na = 1,73 p. 100
K = 0,33 p. 100

D - ESSAIS MICROBIOLOGIQUES /

1 - ETUDE COMPARATIVE DE LA PEPTONE PLACENTAIRE AVEC D'AUTRES PRODUITS COMMERCIAUX .

1.1. ETUDE DES COURBES DE CROISSANCE VIS-A-VIS D'UN GERME-TEST.

1.1.1. Matériel et méthodes.

1.1.1.1. Choix de l'appareillage.

Les auteurs s'accordent à reconnaitre que l'étude comparative des peptones bactériologiques doit s'examiner sous deux aspects :

- la vitesse de multiplication des germes durant la phase exponentielle,

- le rendement maximal des cultures en présence d'une certaine quantité de matière alimentaire.

Classiquement, deux techniques sont utilisées, toutes deux basées sur le fait que le nombre de germes est proportionnel au logarithme népérien du pourcentage de transmission lumineuse (15) (43) (40) durant la phase exponentielle.

1. Le biophotomètre enregistreur de Bonet-Maury.

Appareil déjà ancien, mis au point par Faguet (50) et Bonet-Maury (20), souvent décrit dans la littérature. Nous nous contenterons donc de n'en rappeler que le principe :

Un faisceau lumineux vient frapper, tour à tour, toutes les vingt secondes, six cuves à faces parallèles dans lesquelles s'effectue la culture, et les six faisceaux transmis viennent frapper une cellule photoélectrique.

L'intensité lumineuse est transcrite sur un graphe par le galvanomètre enregistreur, en traçant simultanément les six courbes de croissance.

La culture s'effectue dans des cuves de 10 ml en verre pyrex comportant un barreau magnétique permettant une agitation automatique, réglable en vitesse et en intensité.

L'ordonnée des courbes correspond au pourcentage d'absorption lumineuse, et l'abcisse à l'échelle des temps, le papier se déroulant à raison de 2 cm par heure.

Deux remarques sont à faire sur cet appareil très pratique :

- Chaque cuve ne contient que 10 ml de culture : la moindre impureté, la plus petite différence dans l'ensemencement peut donc fausser complètement le résultat. Il conviendra donc de veiller à la propreté parfaite du matériel et de vérifier la stérilisation des cuves et des milieux de culture en les plaçant, remplies du milieu choisi, une journée à 37° avant l'ensemencement.

- Il existe des concentrations limites au-dessus et au-dessous desquelles l'appareil n'a pas de précision, si bien que les courbes présentent un plateau qui peut faire croire que l'on est parvenu à la fin de la phase exponentielle.

Il y a donc lieu, soit de proposer aux bactéries une quantité d'aliments suffisamment faible pour que la sensibilité maximum corresponde à une utilisation quasi-totale, soit d'utiliser une autre méthode pour apprécier le rendement en germes.

Le biophotomètre a été utilisé et décrit par Painwin (118), Bernard (15), Balis (7), Illien (75), Darbois (40) et Desbordes (43).

2. Le photomètre.

Pour l'étude du rendement, il eut été préjudiciable de procéder à des prélèvements fréquents dans la culture, afin de

mesurer la densité optique, comme c'aurait été le cas avec le photomètre de précision (Labospac) que nous avions à notre disposition.

L'idéal, pour ce genre de travail, est d'utiliser des fioles munies d'un ajustage latéral communiquant avec une cuve à faces parallèles, permettant une lecture sans ouverture du récipient,comme l'a décrit Monod (107).

En l'absence de ce dispositif, nous avons réalisé les cultures dans des éprouvettes stériles à bouchon vissé, testées pour leurs qualités optiques, et placées directement dans un photomètre Lumétron,pour effectuer les lectures à 550 mμ.

Ce procédé, dont nous avons vérifié la valeur, permet la lecture d'un grand nombre de cultures en un temps très bref.

1.1.1.2. Choix du germe-test.

Le rôle de la peptone a été étudié vis-à-vis d'un grand nombre d'organismes et de microorganismes, depuis les champignons pathogènes de la faune et la flore - Candida (115), Alternaria (61), Dactuliophora (113) - jusqu'aux algues : Chlorella (62), en passant par l'amibe (98) et même l'ascaris (45)

En ce qui concerne les bactéries, nombre de germes ont été utilisés : Vibrions (176), bactéries marines (82), terrestres et pathogènes : Pseudomonas (58), Staphylococcus (43), Salmonella (18), E. coli et Klebsiella (40).

Il nous est apparu qu'il était d'usage, pour ce genre d'études, d'utiliser Staphylococcus aureus (souche 101 Institut Pasteur de Lyon), pour les raisons suivantes :

- Ce germe est représentatif d'une flore commune, aéro-anaérobie, d'utilisation courante au laboratoire,

- Permettant une culture homogène à développement suffisamment rapide, sans voile ni agglomérats,

- Equilibré du point de vue nutritionnel et assez exigeant en facteurs de croissance (43).

L'étude bibliographique (26,142,175) a assez bien confirmé l'utilité de cette méthode, suffisante pour apprécier la valeur globale de la peptone, mais insuffisante pour tester son activité vis-à-vis des germes pathogènes. Un prochain chapitre sera donc consacré aux courbes de croissance réalisées avec d'autres germes.

1.1.1.3. Choix des produits commerciaux.

Rappelons qu'on a sélectionné les préparations suivantes pour la comparaison avec la peptone placentaire.

NOM	Laboratoire	Origine	Enzyme	Germes recommandés
Trypticase	BBL	Lait	Pancréat.	Pneumocoques, Lactobacilles, Corynebactéries, Clostridium
Phytone	BBL	Soja	Papaïne	Clostridium, Neisseria
Thiotone	BBL	Viande	Pepsique	Pneumocoques, Streptocoques
Prot. pept. 3	Difco	Viande	?	Corynebacterium, Neisseria Haemophilus, Salmonella
Viande-foie	Organotech.	Viande-foie	Mixte	Anaérobies
Tryptic/soja	BBL	Mixte	Mixte	Tous les germes

1.1.2. *Evaluation biophotométrique de la masse bactérienne.*

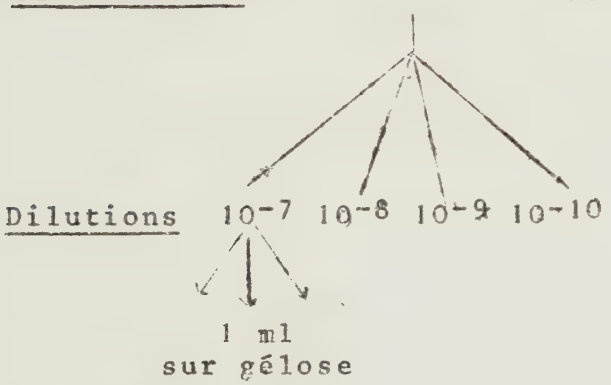
1.1.2.1. *Etalonnage du biophotomètre.*

La concentration en germes étant normalement proportionnelle à la transmission lumineuse dans certaines limites, il était nécessaire de vérifier ce phénomène et de déterminer ces limites. Pour cela, on a procédé à une numération classique.

Bernard (15) utilisa, à cette fin, la cellule compte-microbes, Darbois (40) la méthode de Mac Grady à 5 tubes. Nous avons choisi d'utiliser la numération sur gélose, méthode très critiquée, mais qui présente, cependant, l'avantage de ne numérer que les germes viables et de permettre une évaluation statistique plus précise.

Pour ce faire, nous avons d'abord réalisé des suspensions de germes en eau distillée, correspondant aux différents pourcentages de transmission mesurés par l'appareil.

Puis, chaque suspension a été diluée de 10^{-1} à 10^{-10}. Trois ml des quatre dernières dilutions ont été ensemencés sur gélose, à raison de 1 ml par boite.



Le nombre de colonies a été déterminé après 24 heures d'incubation à 37°.

Ceci nous a permis d'établir le graphique ci-joint (N° 7). On constate qu'entre les degrés de transmission 90 p. 100 et

30 p. 100, le nombre de germes est sensiblement proportionnel à l'intensité du faisceau lumineux transmis.

1.1.2.2. Expérience.

On répartit dans les 6 cuves 5 ml des 6 eaux peptonées à concentration double, c'est-à-dire à 20 grammes de peptone, et 10 grammes de chlorure de sodium par litre. Au moment de l'expérience, on réalise une suspension dans l'eau distillée de St. aureus de 18 heures cultivée sur bouillon ordinaire, remis en suspension dans l'eau distillée et dilué de manière à obtenir une concentration finale de un million de germes par millilitre dans chaque cuve.
On inocule stérilement 5 ml de culture dans chaque cuve.
Nous obtenons donc, de cette manière, 10 ml d'eau peptonée à 10 g/l de peptone et 5 g/l de chlorure de sodium.

Les cuves sont portées au biophotomètre régulé au préalable à 37°.

On laisse l'expérience se poursuivre jusqu'à saturation de l'appareil, c'est-à-dire jusqu'au 0 % de transmission, en maintenant une agitation maximum.

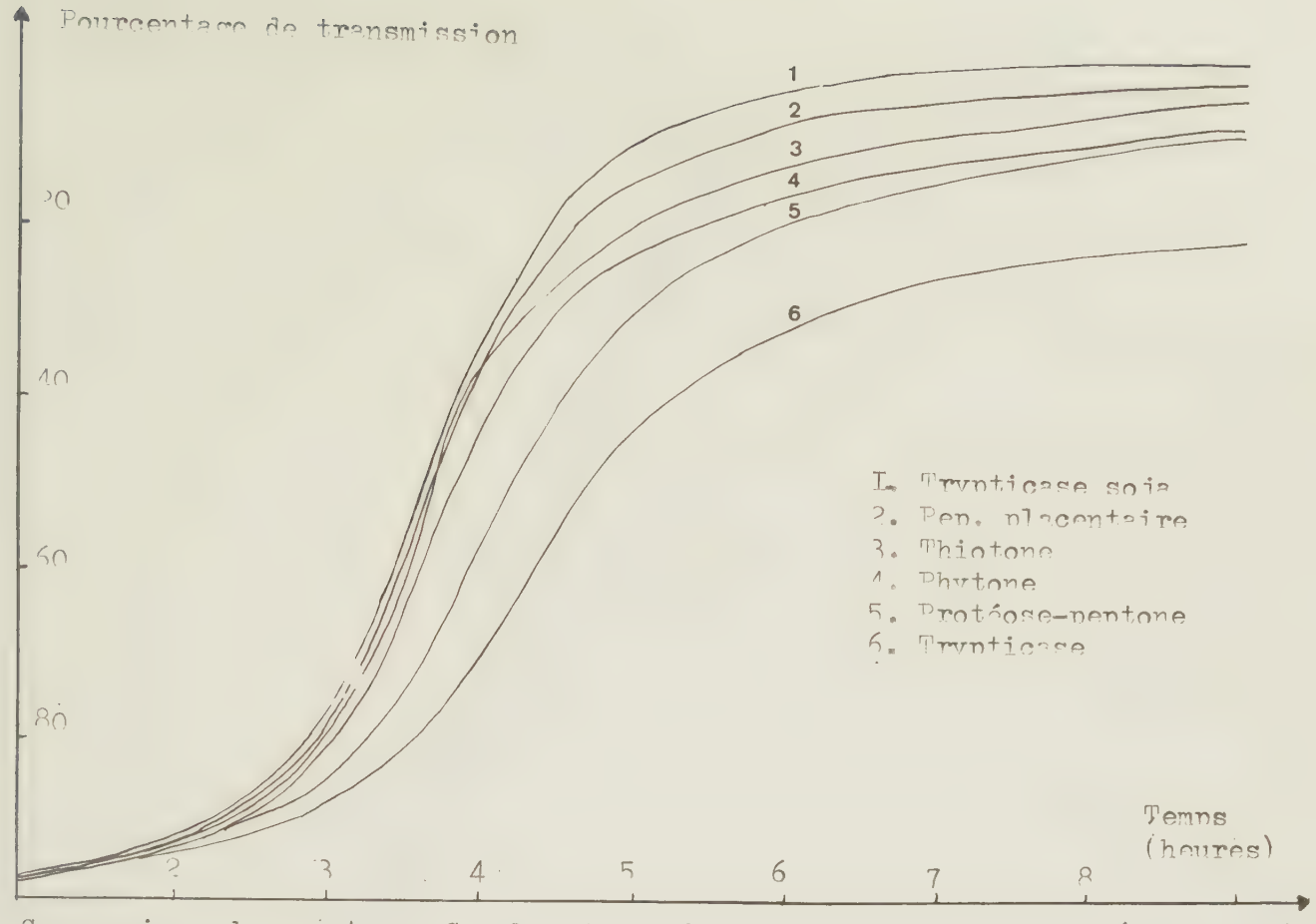
1.1.2.3. Résultats.

Ils sont traduits dans le graphique n° 8.

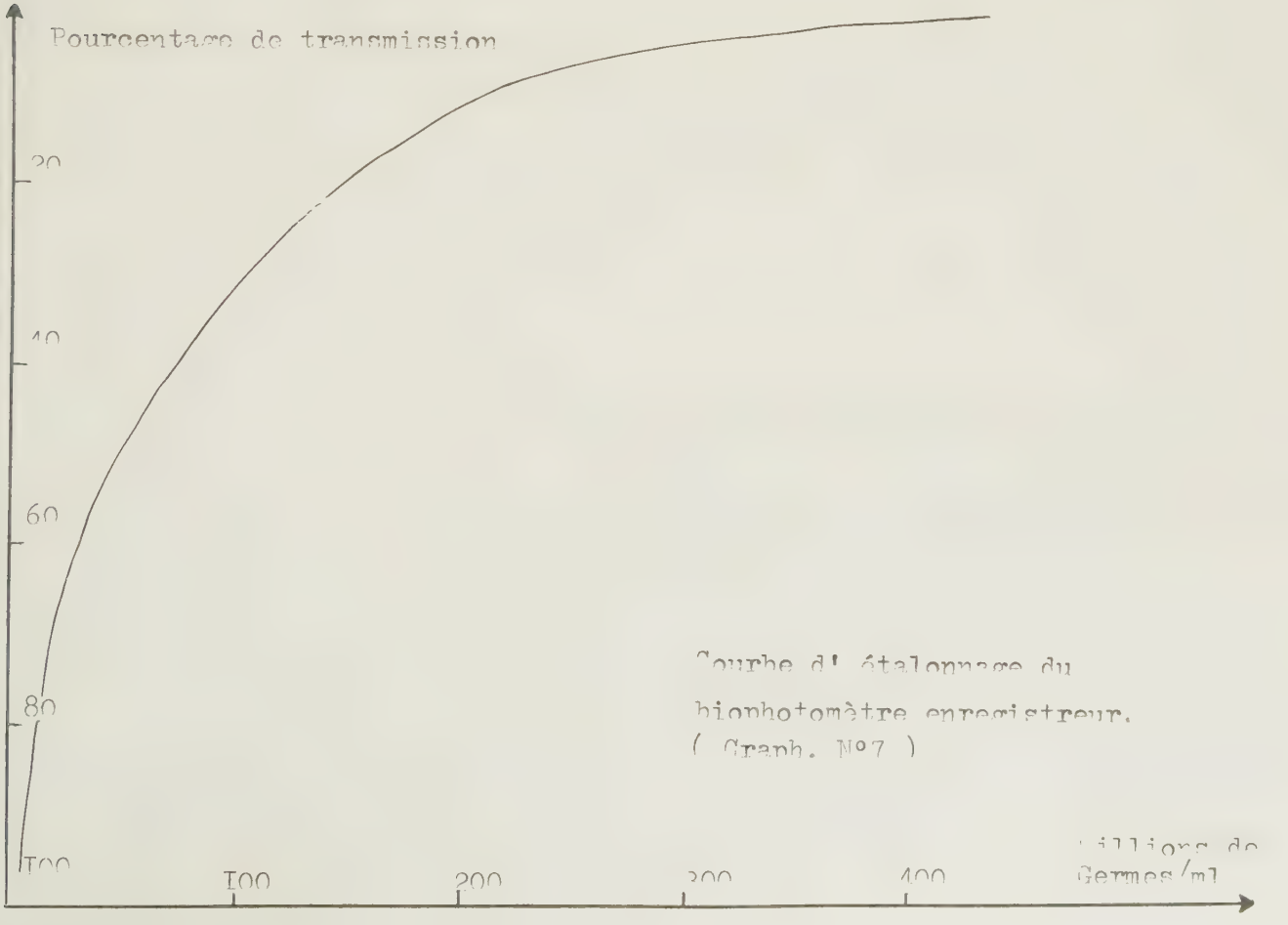
Constatons que notre préparation arrive en seconde position, derrière la trypticase-soja, qui, rappelons le, est une polypeptone.

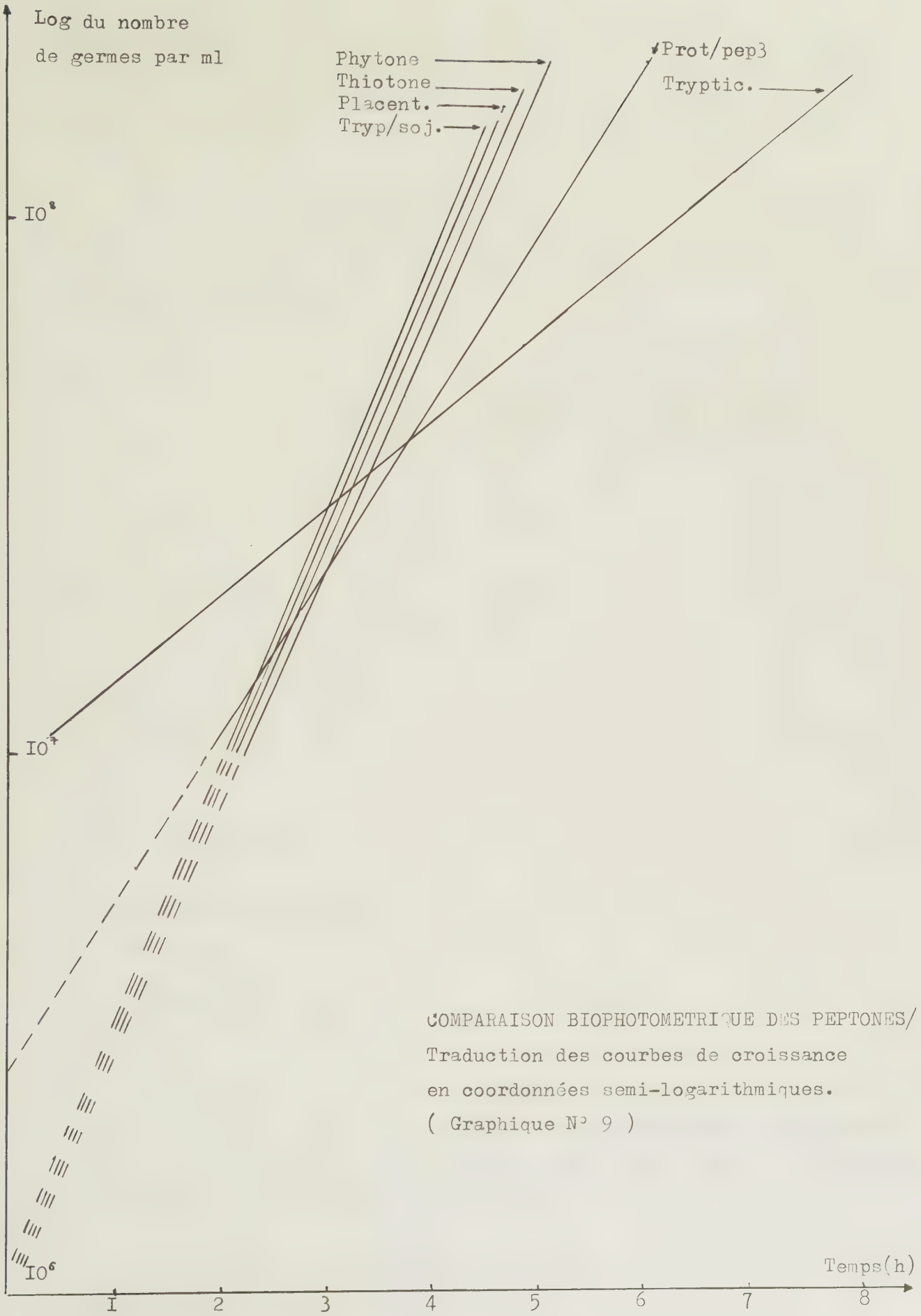
Certains auteurs, en particulier Ninard et Desbordes (43), se contentent d'une estimation graphique par simple comparaison des pourcentages de transmission, approximation confirmée par l'expérience, et que nous utiliserons, d'ailleurs, pour les autres germes testés.

Cependant, pour le germe de référence, il était préférable d'effectuer les numérations précitées afin de comparer les



Comparaison des peptones:Courbes de croissance bionhotomètriques (Graph.n°8)





COMPARAISON BIOPHOTOMETRIQUE DES PEPTONES/
Traduction des courbes de croissance
en coordonnées semi-logarithmiques.
(Graphique N° 9)

temps de génération, valeur la plus universellement acceptée pour les études de croissance bactérienne, depuis les travaux de Monod (107). Le calcul de ce temps de génération est bien connu, et il parait inutile d'en rappeler la théorie (40).

On a représenté également sur le tableau ci-dessous la valeur comparée des produits commerciaux en pourcentage, en prenant comme 100 p. 100 le temps de génération obtenu avec la peptone placentaire.

	Temps en mn (t)	Temps de génération (G)	Valeur comparée : peptone placentaire = 100 %
Trypticase/Soja	250	37,5	102 %
Placentaire (PPLm)	255	38,3	100 %
Thiotone	261	39,6	97 %
Phytone	270	40,6	94 %
Protéose/Peptone 3	310	46	82 %
Trypticase	375	56,4	68 %

Soit le nombre de germes initial No = 1 million de germes
Soit le nombre de germes au temps t (mn) Nt = 100 millions de germes
Soit le nombre de générations N = 6,65
Le temps de génération G = t/N

Constatons que notre préparation permet un développement rapide du germe étudié avec un temps de génération très voisin de celui de la trypticase-soja, qui est, sans doute, le meilleur milieu peptoné existant sur le marché.

Comme le préconise Lambin, on peut également représenter les courbes de croissance obtenues au biophotomètre sur des

coordonnées semi-logarithmiques, en traçant en ordonnée le logarithme du nombre de germes par ml, et le temps en abcisse (graphique n° 9).

Ce graphique nous révèle deux séries de droites :

- celles qui permettent un développement régulier des germes, depuis le début de la culture, puisque toutes les courbes aboutissent au voisinage de l'origine : trypticase-soja, thiotone, phytone, et peptone placentaire ;

- celles qui aboutissent à gauche de l'origine, phénomène s'expliquant, selon Bernard (16), par une multiplication rapide des germes au début de la culture, et ralentie à la fin. On trouve ici la protéose peptone 3 et la trypticase.

Ces essais nous confirment le haut pouvoir nutritif de notre préparation, qui parait se situer au niveau des meilleurs produits commerciaux, d'après ces études biophotométriques.

Intéressons-nous, maintenant, au rendement des cultures en milieu non agité.

1.1.3. Evaluation photométrique du rendement en germes.

Outre le problème de l'obtention d'une masse bactérienne maximum, nous avons choisi d'étudier deux problèmes annexes :

1.1.3.1. L'influence de la pression osmotique.

Les auteurs se sont demandés s'il fallait proposer aux germes un équilibre nutritionnel et osmotique suffisant en réalisant un milieu peptoné, par addition de glucose, de composés minéraux divers (81), ou de NaCl à 5 g/l (16) ou dissoudre simplement la peptone dans l'eau distillée (43). Nous avons tenté de concilier ces points de vue en comparant le rendement en bouillon non salé à 5 g/l de peptone, et salé à 5 g/l de chlorure de sodium pour la même concentration en peptone.

Temps	12 h				24 h			
Résult.	% Trans	% Perte trans			% Trans	% Perte trans		
Dilutions	2 %	1 %	0,5 %	0,5 % S*	2 %	1 %	0,5 %	0,5 % S
Placent.	83	- 9	- 12	- 11	69	- 16	- 26	- 20
Pro pep.	88	- 5	- 9	- 5	77	- 7	- 18	- 7
Tryp/Soja	80	- 9	- 15	- 13	62	- 17	- 32	- 22
Phytone	89	- 6	- 9	- 5	81	- 10	- 15	- 10
Thiotone	88	- 5	- 7	- 7	76	- 10	- 19	- 13
Tryptic.	88	- 6	- 10	- 7	81	- 8	- 14	- 8

Temps	36 h				48 h			
Result.	% Trans	% Perte trans			% Trans	% Perte trans		
Dilutions	2 %	1 %	0,5 %	0,5 % S	2 %	1 %	0,5 %	0,5 % S
Placent.	53	- 25	- 41	- 19	48	- 22	- 42	- 19
Pro pep.	65	- 13	- 30	- 16	61	- 9	- 29	- 5
Tryp/Soja	55	- 20	- 38	- 18	58	- 20	- 32	- 20
Phytone	72	- 11	- 23	- 11	61	- 17	- 33	- 15
Thiotone	61	- 16	- 30	- 15	53	- 20	- 35	- 25
Tryptic.	72	- 10	- 22	- 5	63	- 14	- 29	- 12

* S = NaCl 0.5%

Influence de la dilution et de la pression osmotique sur le rendement en germes . - (Tableau IX) -

(Comparaison des pourcentages de transmission lumineuse obtenus au photomètre Lumetron)

1.1.3.2. L'influence de la dilution.

Desbordes et Ninard (43), puis Darbois (40) avaient étudié au biophotomètre la variation du pouvoir nutritif, lors de la dilution du milieu, et conclu, paradoxalement, que les meilleures peptones devaient subir une baisse importante de leur valeur nutritionnelle, alors qu'on observait peu de changement avec les peptones médiocres. (Ceci, avec certaines exceptions, faisant soupçonner des phénomènes complexes, tels que le remaniement des chaines peptidiques, ou le démasquage de certains ions).

Nous avons jugé que cette appréciation offrait une plus grande fiabilité lorsqu'elle était étudiée en rendement, puisqu'il n'était pas possible d'obtenir au biophotomètre une courbe de croissance totale, au-delà de quelques heures, lorsqu'on utilisait des dilutions supérieures à 5 g/l.

Nos six peptones à tester ont donc été étudiées en solution dans l'eau distillée à 20 g/l, 5 g/l et 1 g/l.

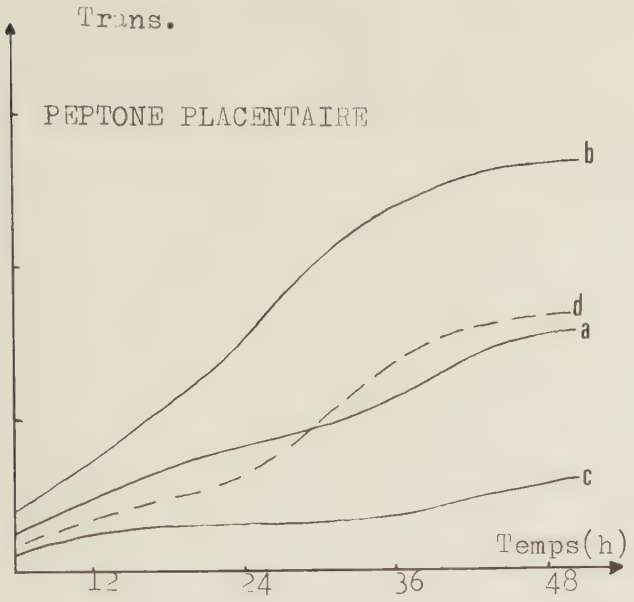
1.1.3.3. Résultats.

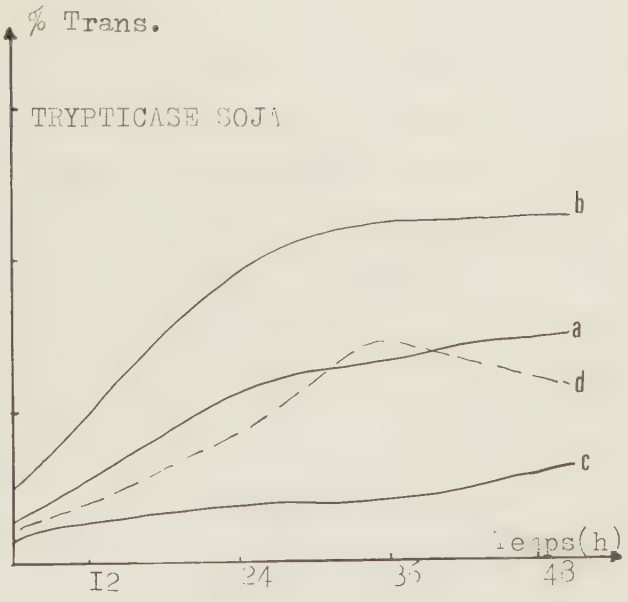
Les bouillons peptonés ont été ensemencés à 10^6 de germes/ml, par une souche de 18 h de St. aureus. Les lectures ont été effectuées après 12, 24, 36 et 48 h, au Lumetron à 480 nm.

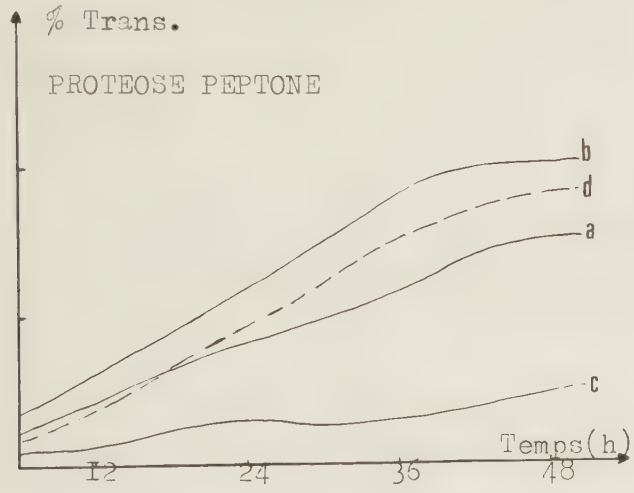
. Dilution :

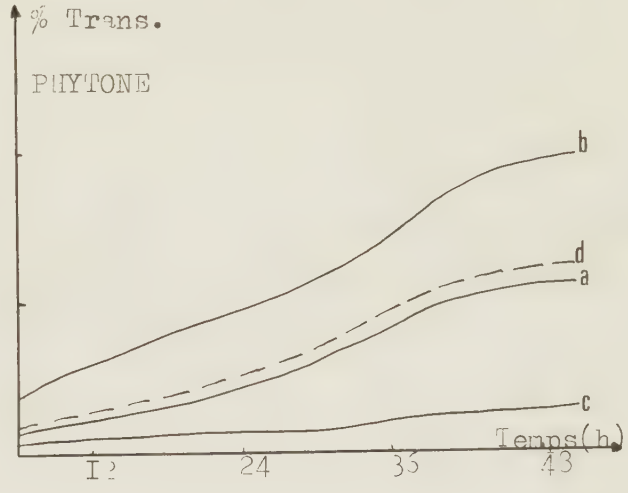
Il apparait sur le tableau IX et les graphiques n° 10 et 11, que les observations de Desbordes et Ninard sont pleinement justifiées, puisque les meilleures peptones (trypticase soja et placentaire) montrent une chute plus forte de leur pouvoir nutritif que les autres, par comparaison du pourcentage de transmission de la plus faible dilution et de celui de la plus forte dilution.

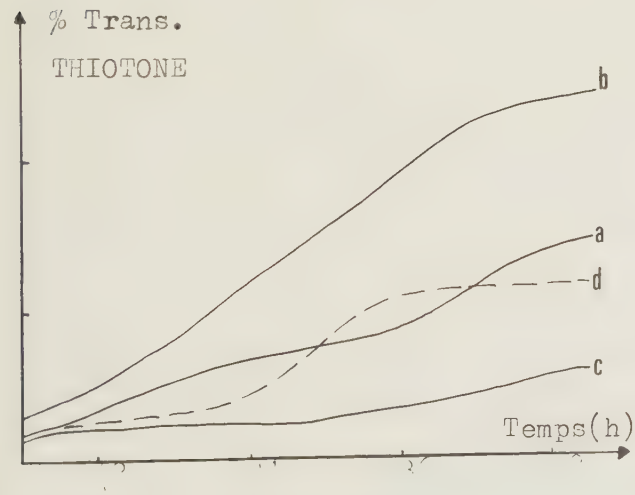
Cependant, les courbes schématisées (graphique n° 11) montrent bien que, même aux faibles dilutions, ces peptones gardent une activité supérieure aux autres.

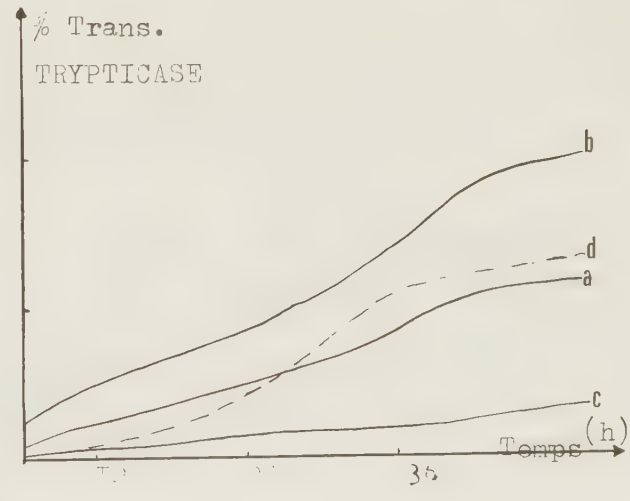












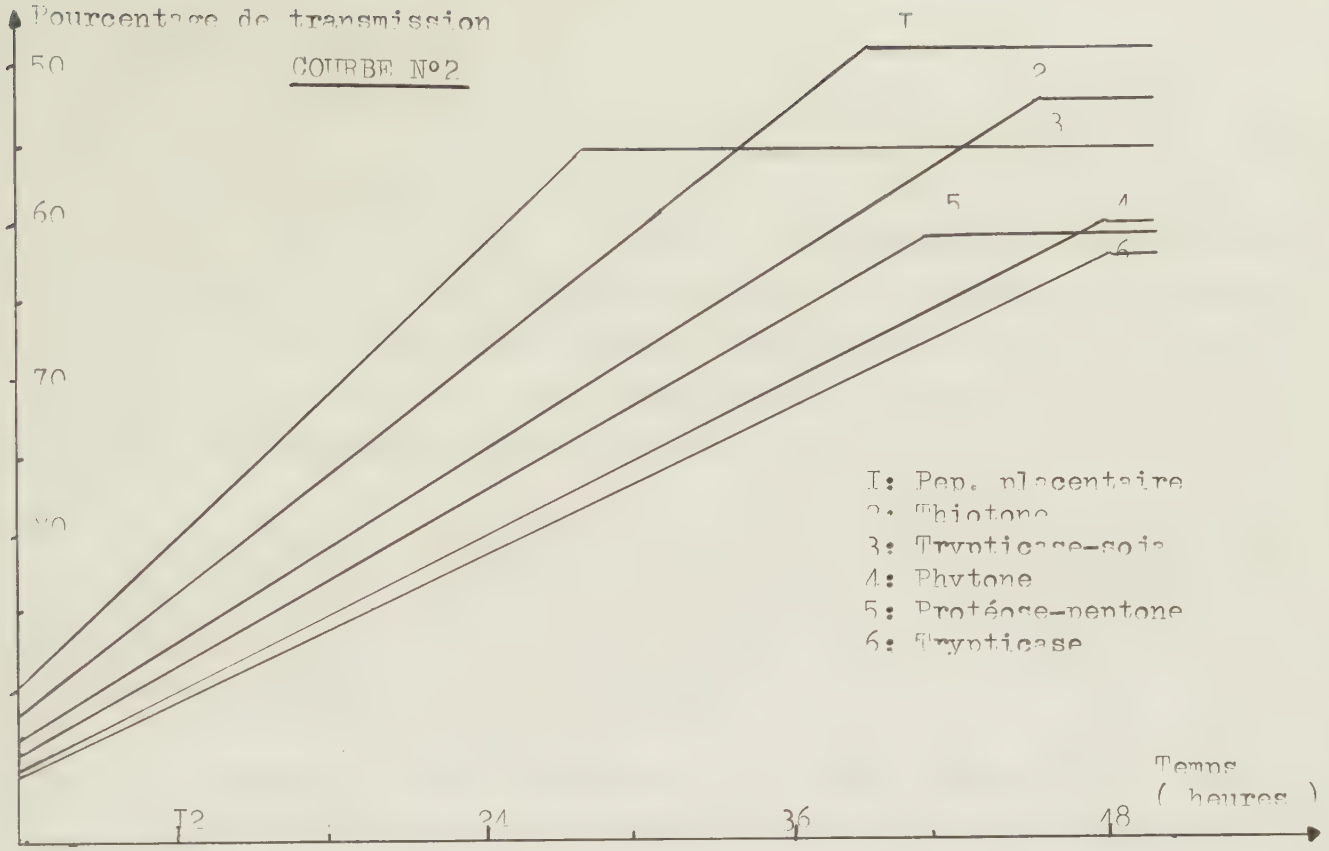
COMPARAISON PHOTOMETRIQUE DU RENDEMENT EN GERMES EN FONCTION DES PEPTONES, DE LA DILUTION ET DE LA PRESSION OSMOTIQUE: (GRAPH.IO)

A = Peptones à 1%

B = Peptones à 2%

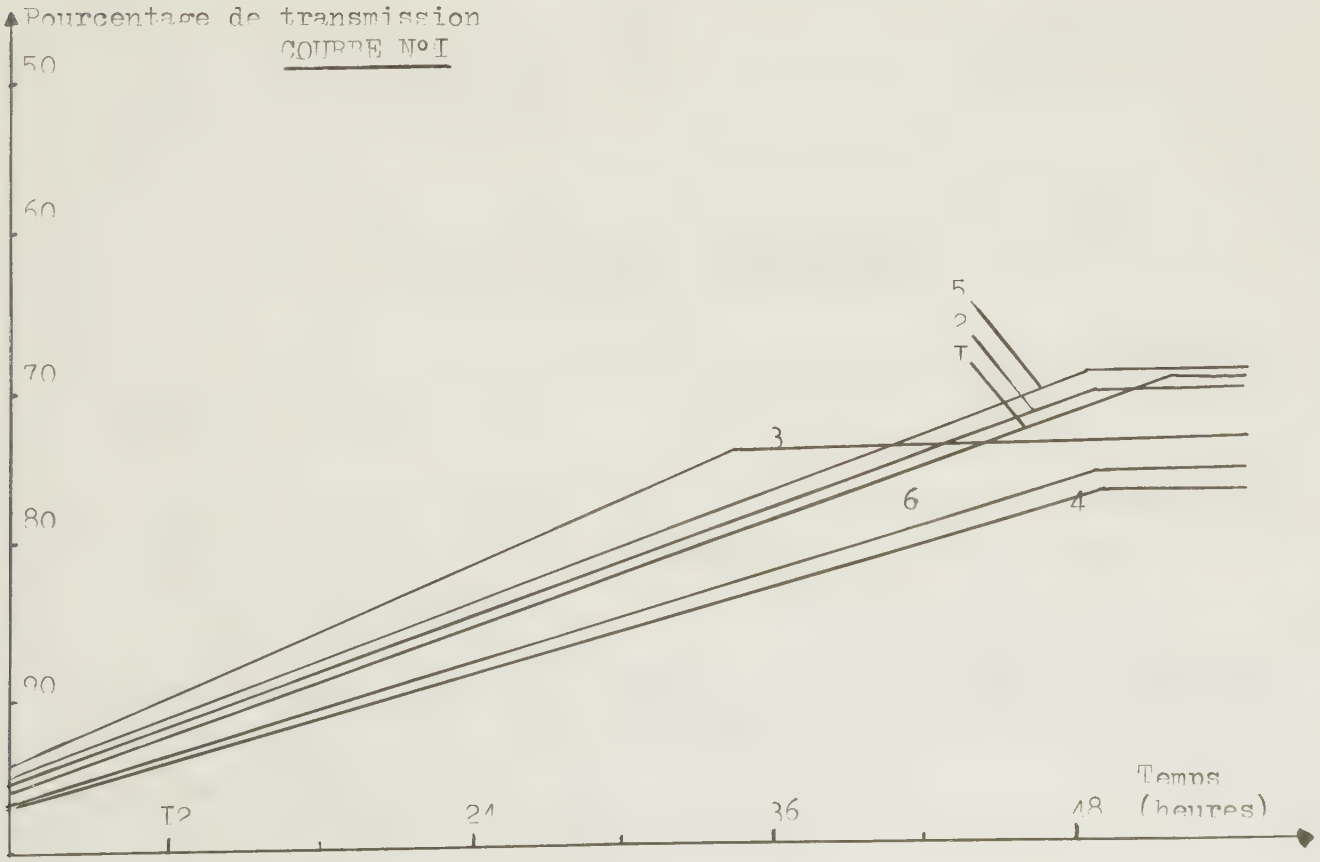
C = Peptones à 0,5%

D = Peptones à 0,5%+ 0,5% NaCL



EVALUATION PHOTOMETRIQUE DU RENDEMENT: Influence de la dilution (Graph II)

{ N°1: Peptones à T°
{ N°2: Peptones à 2°



. Pression osmotique :

Bien que l'affinité du staphylocoque pour le chlorure de sodium soit bien connue, on ne peut se retenir d'être surpris, lorsqu'on constate que, pour toutes les peptones testées, le pouvoir nutritif d'une solution à 5 g/l salée au même taux est équivalent, et même parfois supérieur à celui de la même solution à 10 g/l non salée. Cette extrême sensibilité au sel est, sans doute, la plus vive critique que l'on puisse faire à l'utilisation de Staphylococcus aureus comme germe test.

En effet, le taux de chlorure de sodium des peptones est très variable, et particulièrement élevé pour les préparations pepsiques et les hydrolysats acides, qui ont été neutralisées avec de grandes quantités de soude.

Il semble donc préférable d'utiliser une eau peptonée classique (salée à 5 g/l) plutôt qu'une simple solution dans l'eau distillée, afin d'assurer aux germes une tonicité minimum du milieu et d'équilibrer les concentrations salines.

Quoi qu'il en soit, remarquons le comportement de notre peptone placentaire, qui fournit le plus fort rendement en germes, quelle que soit la concentration.

1.2. ETUDE DE COURBES DE CROISSANCE VIS-A-VIS DE DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES.

On s'est attaché, dans ce chapitre, à résoudre les problèmes suivants :

- l'étude d'autres germes-test confirme-t-elle ou infirme-t-elle les conclusions tirées précédemment de la croissance de Staphylococcus aureus ?
- notre préparation est-elle apte à la croissance de microorganismes exigeants, comparativement aux autres produits commerciaux sélectionnés ?

1.2.1. Germes aérobies.

1.2.1.1. Choix des souches.

Nous avons étudié la pousse en milieux solides et liquides de plus de 40 espèces différentes de germes pathogènes, à l'aide de souches choisies dans la collection de l'Institut Pasteur de Lyon.

Ces souches lyophilisées présentent, parfois, l'inconvénient d'être déjà adaptées à la culture sur milieux artificiels. Cependant, la stabilité de leurs caractères nous les a fait préférer à l'utilisation de germes provenant directement de malades.

1.2.1.2. Choix de la méthode.

1. Appareillage.

Le biophotomètre enregistreur, déjà décrit, a été utilisé dans la plupart des cas.

Rappelons que l'un des rares problèmes posés par cet appareil est représenté par son absence de sensibilité au-delà d'une certaine densité optique, la phase plateau terminale n'étant en fait que l'obtention du 0 % de transmission - fait extrêmement gênant, puisqu'il ne donne aucune estimation du rendement en germes.

Pour tourner cette difficulté, nous avons choisi d'utiliser (pour des milieux salés à 5 g/l) :

- une faible concentration de peptone (5 g/l) pour les germes peu exigeants ;
- une plus forte concentration (20 g/l) pour les germes difficiles, généralement insuffisante, cependant, pour saturer l'appareil.

Dans ces conditions de milieu extrêmement pauvre (absence de glucides, peu de sels minéraux, etc...), la plupart des

germes ont achevé leur croissance par une phase plateau véritable, correspondant à une croissance maximale.

2. Expression des résultats.

Du point de vue purement scientifique, l'idéal aurait consisté à procéder à des numérations sur tous les germes au cours des expériences.

Le nombre et la variété des espèces, les impératifs de temps, de matériel et de moyens n'étaient, malheureusement, pas compatibles avec une telle méthode.

En outre, on pouvait se demander quel intérêt supplémentaire, on l'a vu pour le germe-test, le calcul des temps de génération pouvait présenter, par rapport à l'examen des courbes de croissance.

Aussi, les recherches antérieures ayant suffisamment prouvé la correspondance entre le nombre de germes et la densité optique, nous sommes-nous contentés, comme l'avaient fait Ninard et Desbordes avec succès (43), de comparer les courbes de croissance, selon les pourcentages de transmission obtenus. On a retenu trois paramètres :

T Lat : le temps de latence (en heures),
T Max : le temps nécessaire pour obtenir une pousse maximum (en heures),
% Trans.Max : la valeur du maximum de pousse (en pourcentage de transmission maximum).

Notons que le système d'agitation des cuves a permis, quels que soient l'activité respiratoire et le mode de pousse des germes (voile, trouble, dépôt, grumeaux), d'obtenir des solutions homogènes, comme en atteste la régularité des courbes obtenues.

3. Ensemencement et contrôles.

- L'ensemencement a été choisi pour chaque germe, de telle sorte qu'il assure un temps de latence supérieur à 2 heures, condition absolue de validité des observations.

- Les contrôles de pureté et des propriétés biochimiques de la souche ont été réalisés avant chaque expérience.

A l'issue de chacune d'elles, on vérifie seulement la pureté de la culture et la morphologie du germe par examen microscopique.

Nous avons fait figurer, dans les pages suivantes, les courbes de croissance les plus intéressantes, précédées d'un rappel très succint des besoins nutritifs de chaque germe.

GERME : *Streptococcus pneumoniae 1150 (type 1) IPL.*

. *Milieu* : Peptone 20 g/1, NaCl 5 g/1.

. *Contrôle* : Diplocoques gram-positif, morphologie, culture, catalase -, lyse par la bile et l'optochine, virulence sur la souris.

. *Besoins nutritifs* : Germe difficile, pousse faible en milieu ordinaire, pousse augmentée en présence de sérum, d'ascite, besoins en facteurs du sang (97).

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	PH	PP	TS	PR	TH	T
T Lat	4	4,30	3	5	5,30	-
T Max	9	13	8,30	13	14	-
% Trans max	45	46	62	68	80	98

. *Courbe de croissance* : N° 1.

GERME : *Streptococcus faecalis 9 IPL.*

. *Milieu* : Peptone 5 g/1 - NaCl 5 g/1.

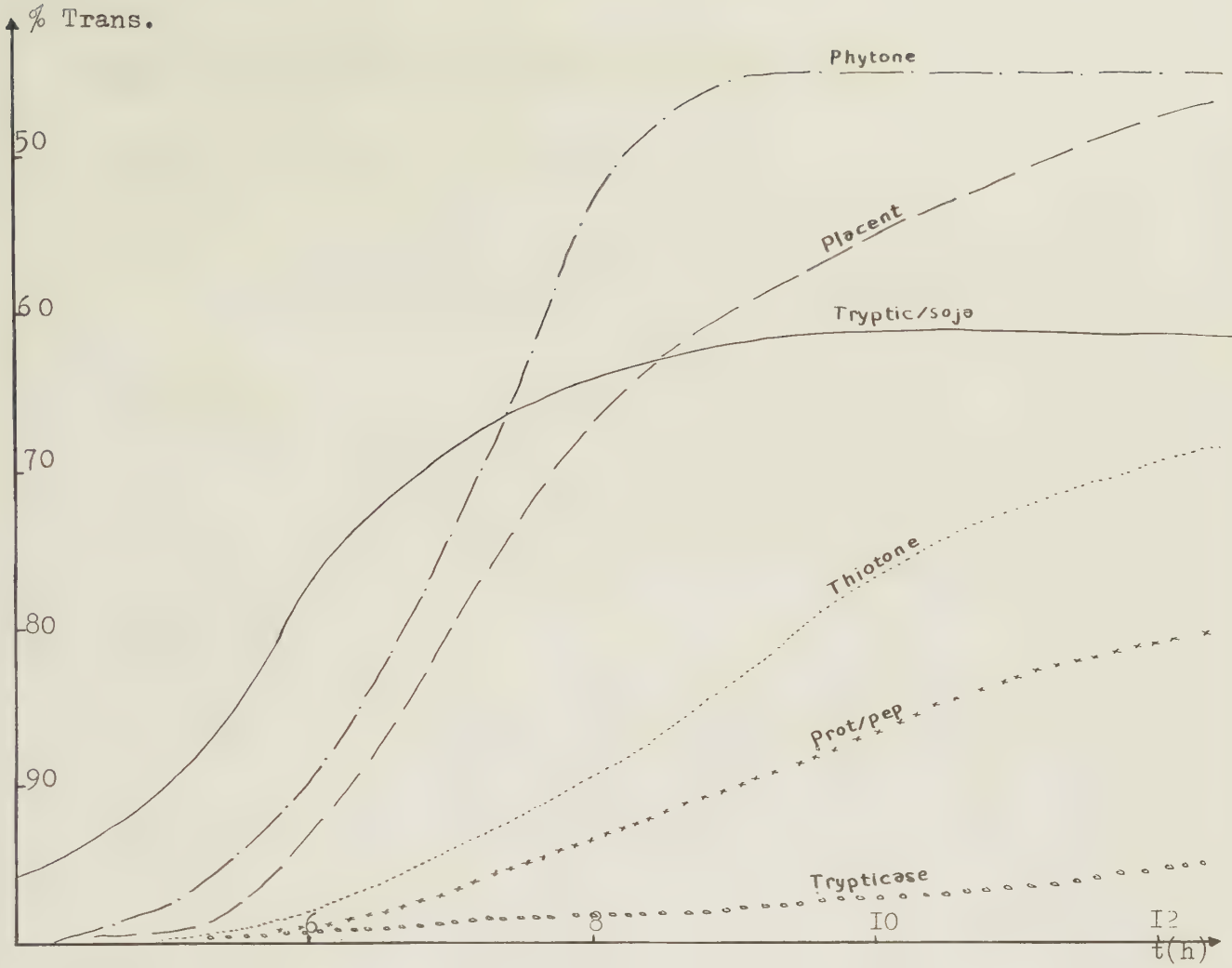
. *Contrôle* : Cocci Gram-positif, morphologie, pousse en milieux hostiles (bile tellurite et à 40°), lait +, gélatine -, sorbitol +.

. *Besoins nutritifs* : Pousse en milieu ordinaire, mais exigences nombreuses : acide folique, pyridoxal, biotine, acide lipoïque, histidine, méthionine, thréonine, K^{+}, Mg^{++}, Mn^{++}, (152) (177) (163).

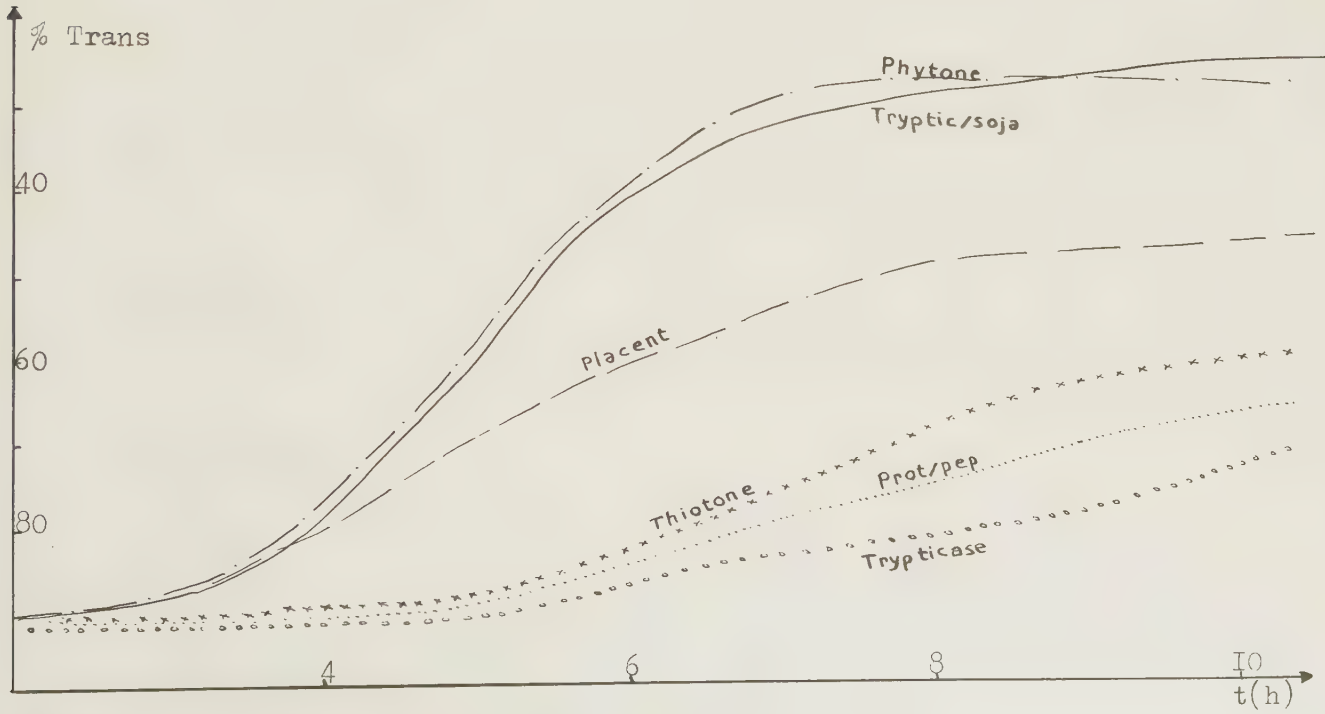
. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	TS	PH	PP	TH	PR	T
T Lat	2	2	2,15	4	4,30	5
T Max	7	10	10	11	11,30	11
% Trans max	25	27	45	57	62	66

. *Courbe de croissance* : N° 2.



COURBE DE CROISSANCE N°I : Streptococcus pneumoniae II50



COURBE DE CROISSANCE N°2 : Streptococcus faecalis 9

GERME : *Neisseria meningitidis 484 IPL.*

. *Milieu* : Peptone 20 g/l, NaCl 5 g/l.

. *Contrôle* : Diplocoques gram-négatif, morphologie, culture, oxydase ++ rapide, saccharose -, sensibilité à la pénicilline, pousse + à 37°, - à 20°.

. *Besoins nutritifs* : Germe très difficile, besoins en CO_2, humidité, facteur V, groupements SH (cystéine, des groupes glutamine, glutathion, méthionine), vitamines B et PP. Inhibition par les acides gras des peptones.

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	PR	TH	PP	TS	PH	T
T Lat	6,30	6,30	6,45	7	12	-
T Max	22	28	14	26	27	-
% Trans max	27	30	47	57	63	99

. *Courbe de croissance* : N° 3.

GERME : *Neisseria sicca 359 IPL.*

. *Milieu* : Peptone 20 g/l, NaCl 5 g/l.

. *Contrôle* : Diplocoques gram-négatif, morphologie, culture, oxydase ++ lente, saccharose +, résistant à la pénicilline, pousse à température ordinaire.

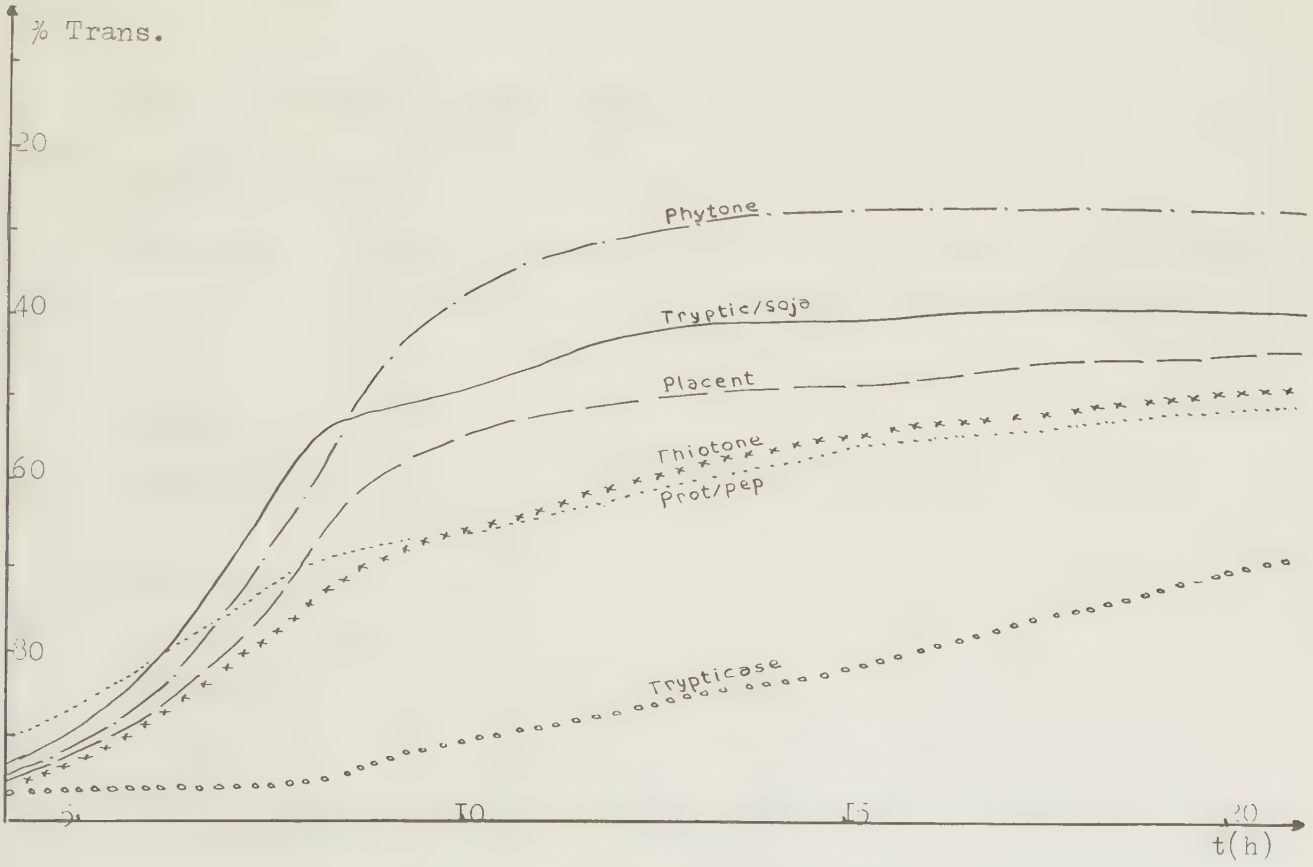
. *Besoins nutritifs* : Plus faibles que le méningocoque, mais pousse assez réduite en eau peptonée (donc exigeant).

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	PH	TS	PP	TH	PR	T
T Lat	3,30	3,15	3,45	3,30	3,30	7
T Max	14	14	20	23	24	24
% Trans max	27	39	42	47	49	67

. *Courbe de croissance* : N° 4.

COURBE DE CROISSANCE N°3 : Neisseria meningitidis 484



COURBE DE CROISSANCE N°4: Neisseria sicca359

GERME : *Escherichia coli (111 B4) 415 IPL.*

. *Milieu* : Peptone 5 g/l, NaCl 5 g/l.

. *Contrôle* : Bacille gram-négatif, taille, culture, mobilité. Glucose +, oxydase -, nitrates +, indole +, ONPG +, H_2S -, citrate -.

. *Besoins nutritifs* : Très faibles. Synthèse de tous les facteurs de croissance (100).

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	TS	PP	PR	TH	PH	TT
T Lat	2	2	2	2	2	2
T Max	8	9,30	11	11	11	13
% Trans max	0	0	0	0	0	0

. *Courbe de croissance* : *N° 5.*

GERME : *Salmonella typhi 948 IPL.*

. *Milieu* : Peptone 5 g/l - NaCl 5 g/l.

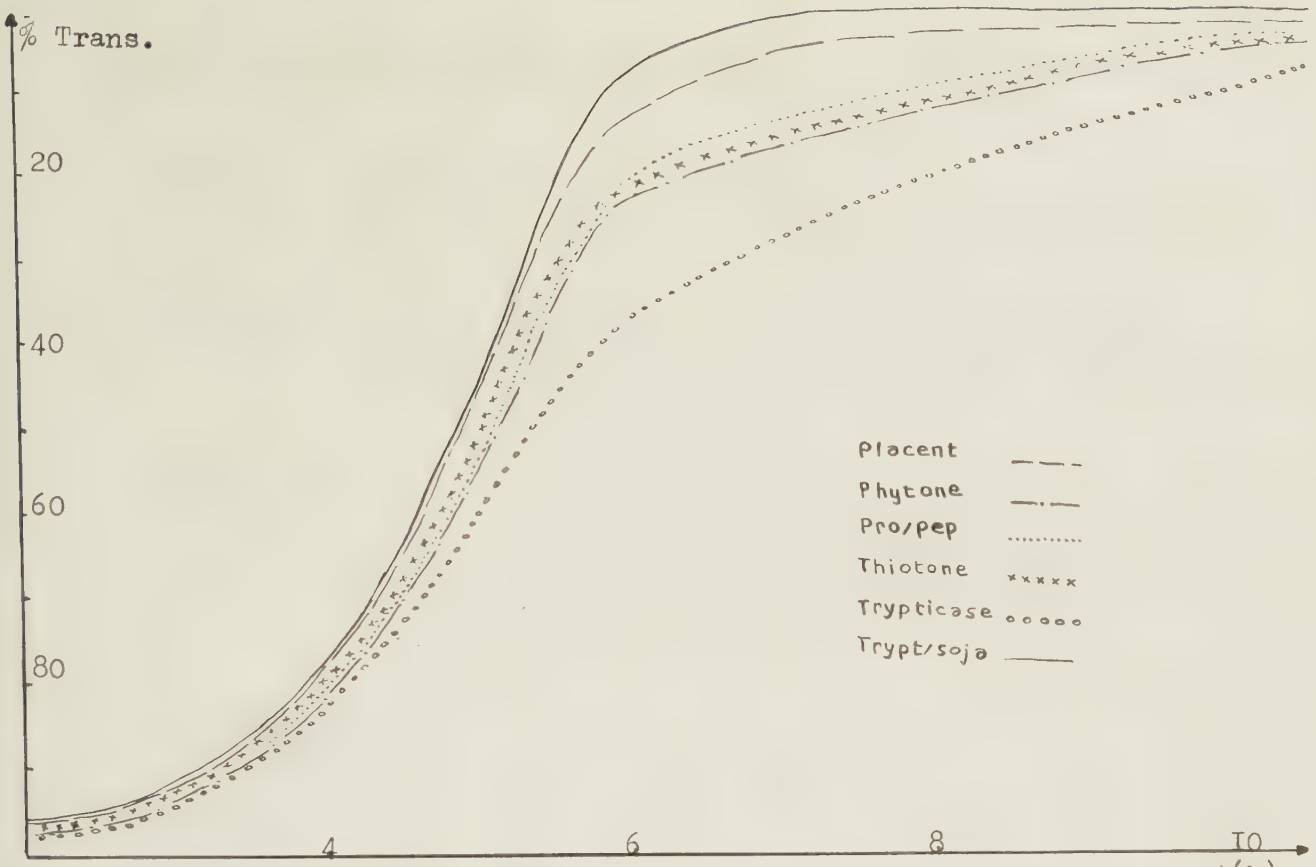
. *Contrôle* : Bacille gram-négatif, taille, culture, mobilité. Glucose +, oxydase -, nitrates +, indole -, ONPG -, H_2S +, citrate -.

. *Besoins nutritifs* : Très faibles. Pousse abondante en bouillon ordinaire.

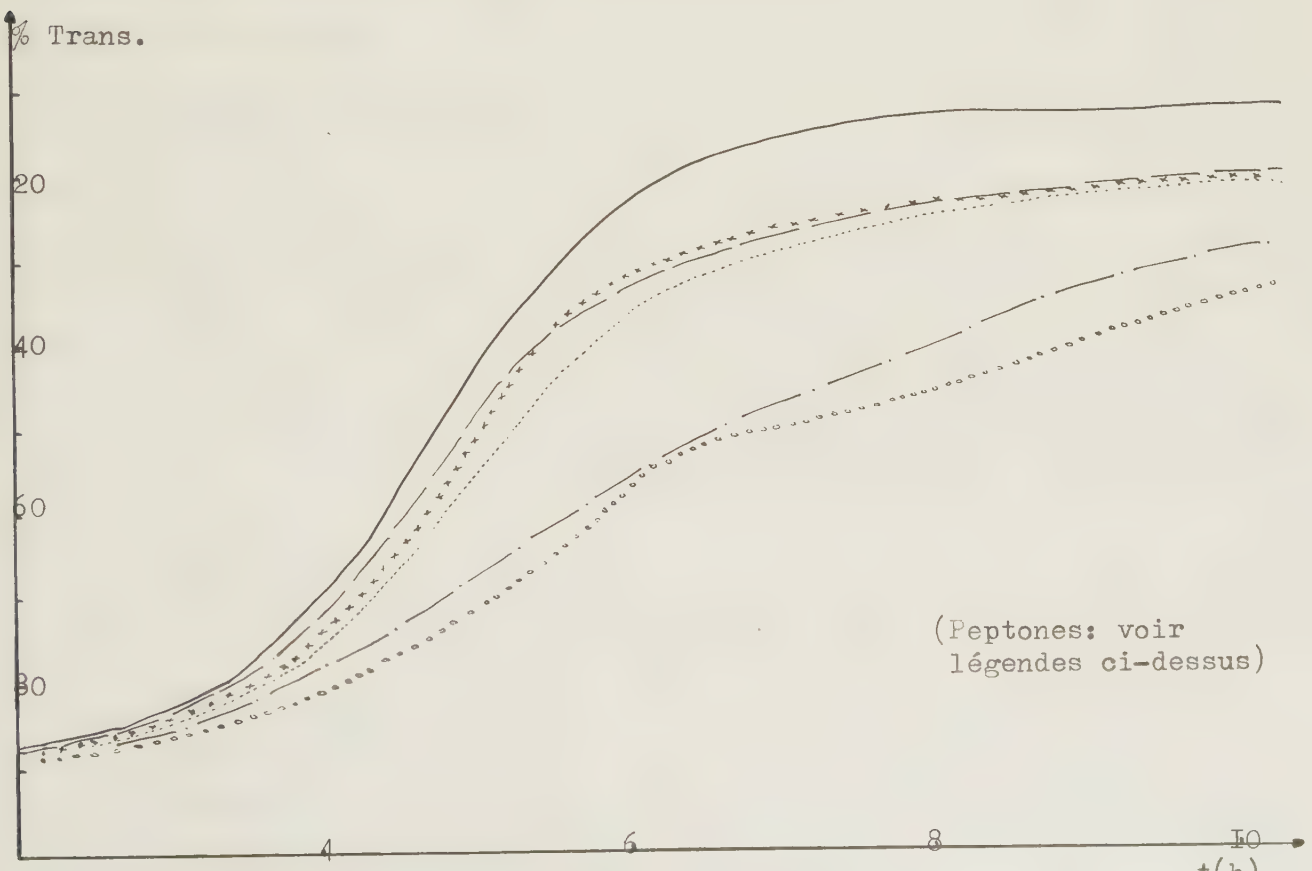
. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	TS	PP	TH	PR	PH	T
T Lat	2	2	2	2	2	2
T Max	8	11	11	11,30	11	12
% Trans max	15	20	21	22	28	29

. *Courbe de croissance* : *N° 6.*



COURBE DE CROISSANCE N°5 : Escherichia coli 415



COURBE DE CROISSANCE N° 6 : Salmonella typhi 948

GERME : *Brucella abortus* B_{19} (*souche vaccinale*) *IPL*.

. *Milieu* : Peptone 20 g/l, NaCl 5 g/l.

N.B. La tryptose (TP, milieu spécial Brucella) remplace la trypticase.

. *Contrôle* : Bacille gram-négatif, morphologie (taille), culture, immobile, urée +++, SH_2+, VP-, protéolyse.

. *Besoins nutritifs* : Germe très exigeant. Pousse très faible. Demande CO_2, thiamine, acide pantothénique, protéines (sang, sérum, ascite). Substance inhibitrice dans les peptones (147) (148).

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	TH	TP	PP	PR	PH	TS
T Lat	6	6	6,15	6,15	7	7
T Max	29	31	31	31	32	33
% Trans max	52	56	56	56	57	57

. *Courbe de croissance* : *N° 7*.

GERME : *Pasteurella multocida 6762 IPL*.

. *Milieu* : Peptone 20 g/l, NaCl 5 g/l.

. *Contrôle* : Bacille gram-négatif, morphologie, taille, culture, immobile asporulé, indole +, protéolyse -, glucose +, catalase +, nitrites +, SH_2+, urée -.

. *Besoins nutritifs* : Germe exigeant : acide nicotinique, acide pantothénique, protéines (sang, sérum, ascite).

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	PP	TH	PR	TS	PH	T
T Lat	2,15	2,15	2,15	2	2	-
T Max	9	9	10,30	11	12	-
% Trans max	40	44	45	45	52	98

. *Courbe de croissance* : *N° 8*.

GERME : *Brucella abortus* B_{19} (*souche vaccinale*) *IPL*.

. *Milieu* : Peptone 20 g/1, NaCl 5 g/1.

N.B. La tryptose (TP, milieu spécial Brucella) remplace la trypticase.

. *Contrôle* : Bacille gram-négatif, morphologie (taille), culture, immobile, urée +++, SH_2+, VP-, protéolyse.

. *Besoins nutritifs* : Germe très exigeant. Pousse très faible. Demande CO_2, thiamine, acide pantothénique, protéines (sang, sérum, ascite). Substance inhibitrice dans les peptones (147) (148).

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	TH	TP	PP	PR	PH	TS
T Lat	6	6	6,15	6,15	7	7
T Max	29	31	31	31	32	33
% Trans max	52	56	56	56	57	57

. *Courbe de croissance* : *N° 7*.

GERME : *Pasteurella multocida 6762 IPL*.

. *Milieu* : Peptone 20 g/1, NaCl 5 g/1.

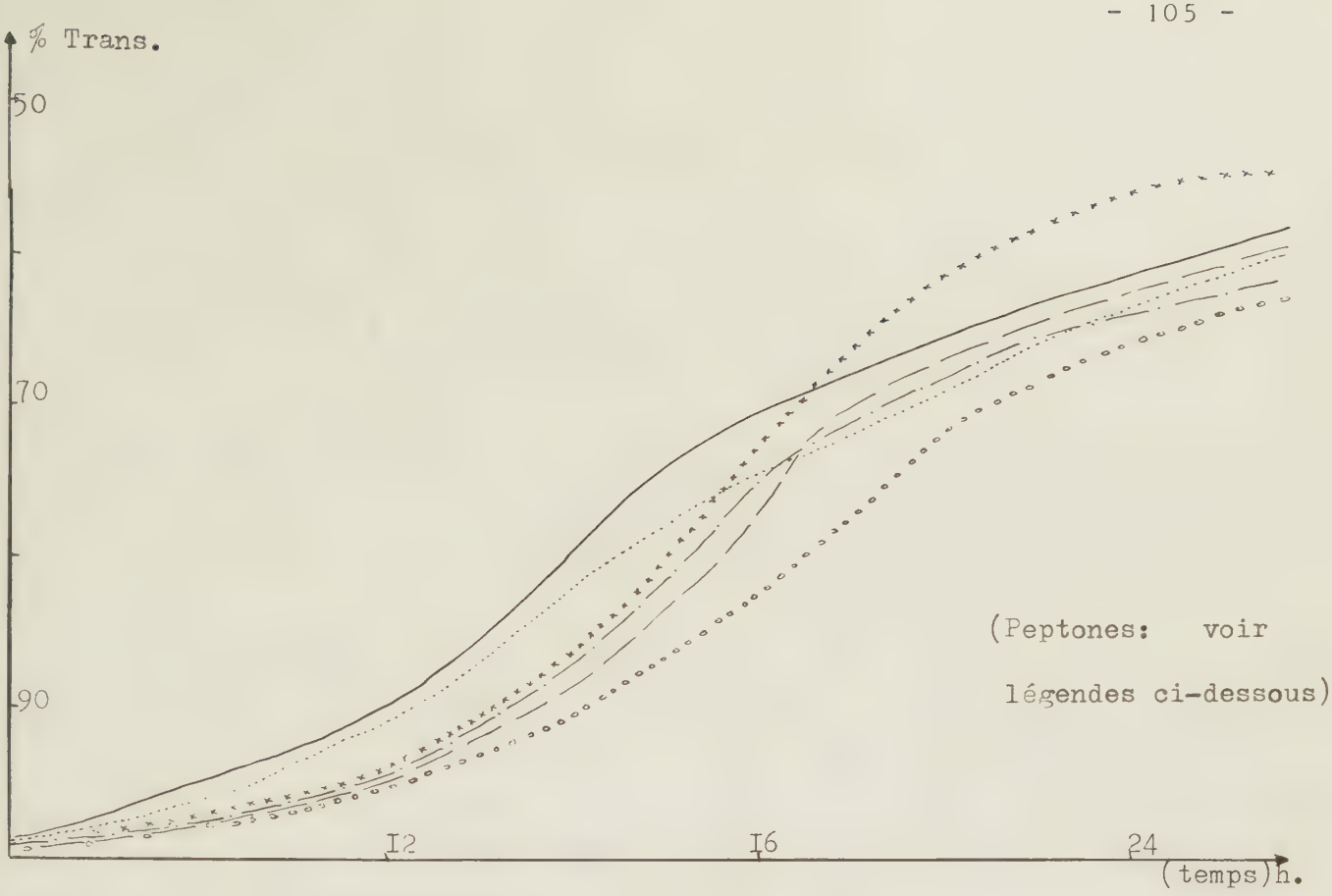
. *Contrôle* : Bacille gram-négatif, morphologie, taille, culture, immobile asporulé, indole +, protéolyse -, glucose +, catalase +, nitrites +, SH_2+, urée -.

. *Besoins nutritifs* : Germe exigeant : acide nicotinique, acide pantothénique, protéines (sang, sérum, ascite).

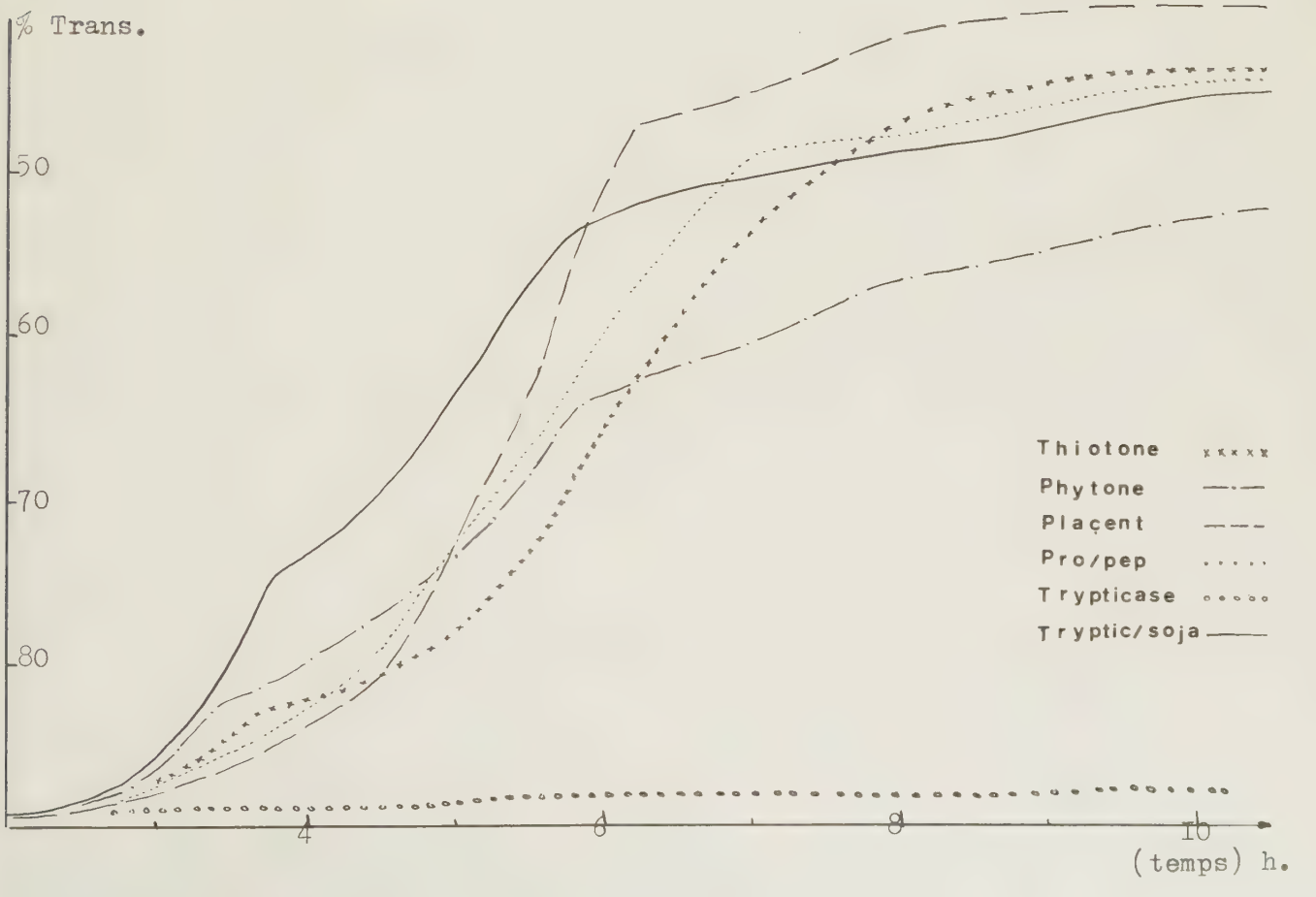
. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	PP	TH	PR	TS	PH	T
T Lat	2,15	2,15	2,15	2	2	-
T Max	9	9	10,30	11	12	-
% Trans max	40	44	45	45	52	98

. *Courbe de croissance* : *N° 8*.



COURBE DE CROISSANCE N° 7 : Brucella abortus B 19 .



COURBE DE CROISSANCE N° 8 : Pasteurella multocida 6762

Germe : Hemophilus parainfluenzae (isolement IPL)

- Milieu : Peptones 20 g/l , NaCL 5 g/l

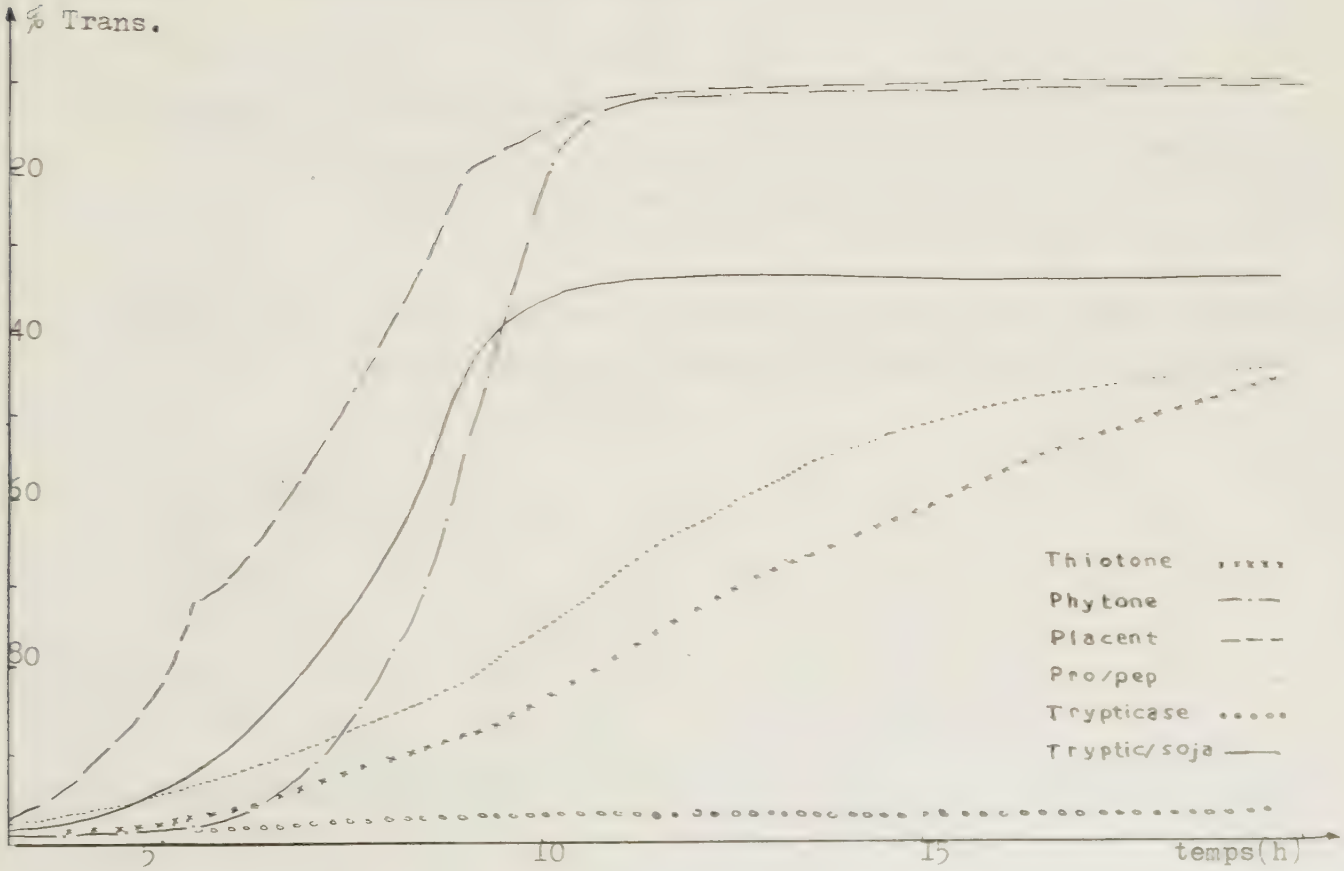
- Controles : Bacilles gram-négatifs,morphologie,taille,culture
(gélose ordinaire - , gélose sang +)

- Besoins nutritifs : Exigeant, demande acide nicotinique, acides aminés(70),besoins en facteur V,pas en facteur X (voir R. pseudoinsolita) (7I)

- Expérience :

Ordre d'arrivée	I	2	3	4	5	6
Peptones	PP	PH	TS	PR	TH	T
T Latence	3	6	3	3.30	6	I9
T Max	I2	I2	II	I9	24	25
% Trans. Max	II	II	34	37	43	80

- Courbe de croissance N° 9 :



GERME : *Listeria monocytogenes 2116 IPL.*

. *Milieu* : Peptone 20 g/l, NaCl 5 g/l.

. *Contrôle* : Bacille gram-positif, morphologie, taille, mobilité à 22°, culture (gel.sang).
Catalase +, esculine +, ONPG +.

. *Besoins nutritifs* : Moyens et assez mal connus (54) : riboflavine, thiamine (en combinaison avec riboflavine), sans doute pyridoxine et biotine (discuté : (170).

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	TS	PP	PR	TH	PH	T
T Lat	3	3	3	3	3	3
T Max	11	11	12,30	14	12,30	6,30
% Trans max	20	37	43	45	64	77

. *Courbe de croissance* : *N° 10.*

GERME : *Corynebacterium diphteriae 330 IPL.*

. *Milieu* : Peptone 20 g/l, NaCl 5 g/l.

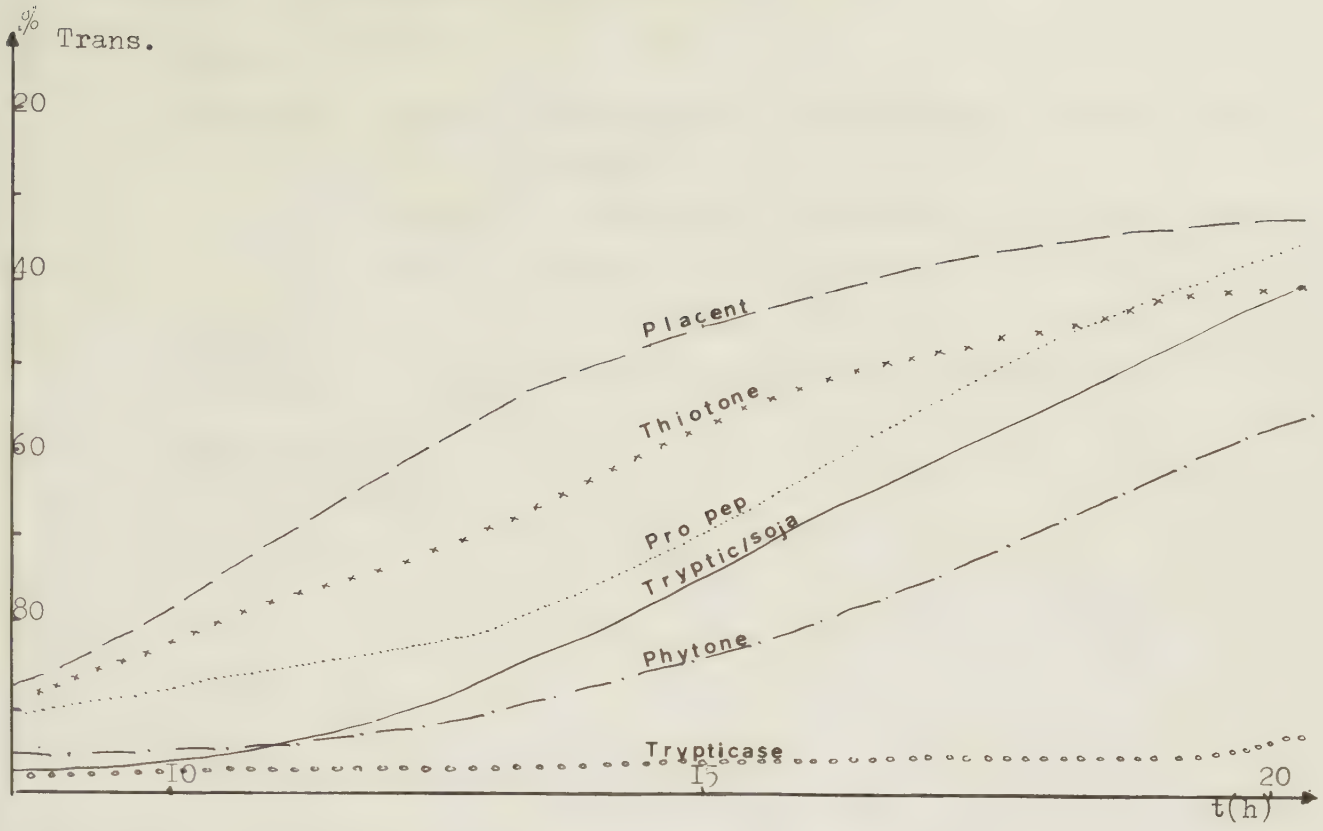
. *Contrôle* : Bacille gram-positif, morphologie, culture.
Glucose +, lactose -, saccharose -, nitrates +, H_2S ±. Précipitation en milieu gélosé avec antisérum.

. *Besoins nutritifs* : Germe exigeant, demande acide nicotinique, acide pantothénique, acide pimélique, biotine, cystéine, fer, cuivre, zinc.

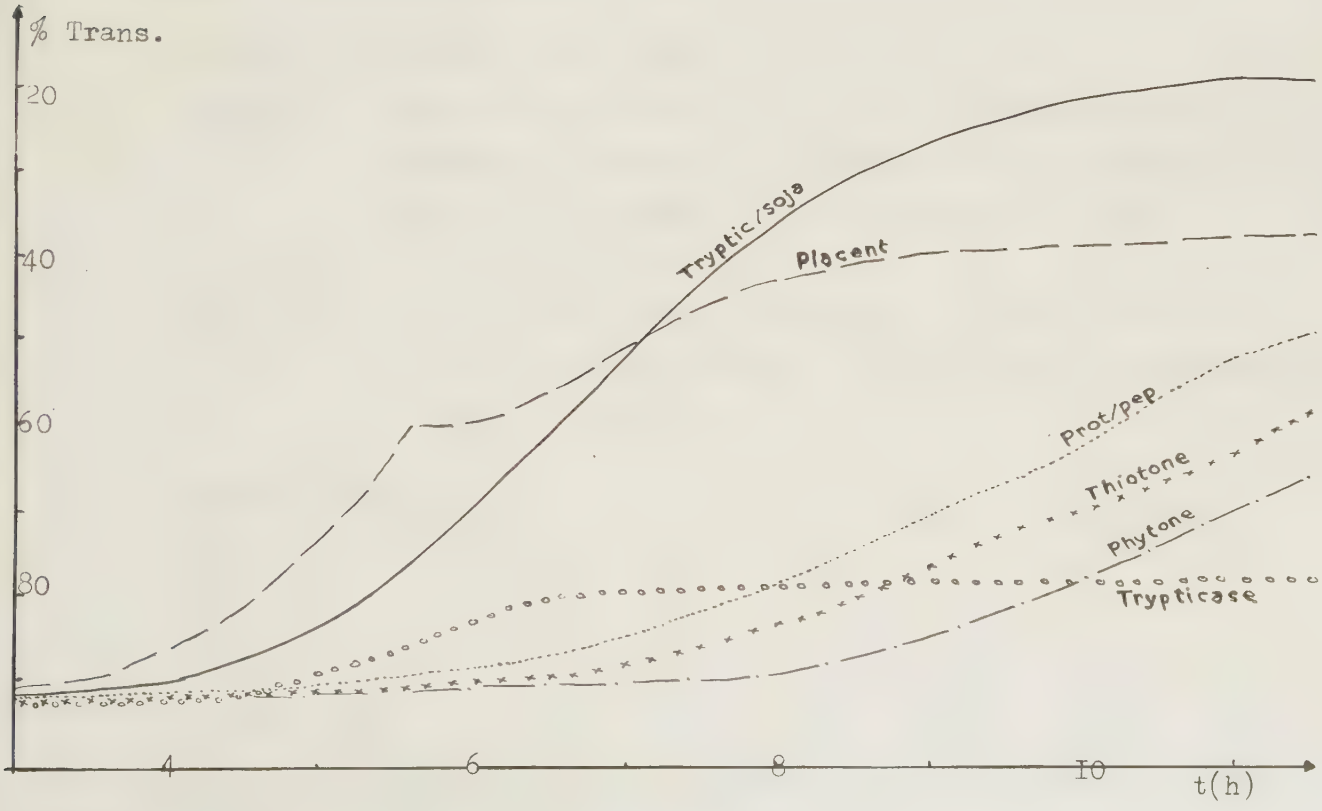
. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	PP	PR	TS	TH	PH	T
T Lat	8,30	9	9	8,30	11	20
T Max	20	21	20,30	20	24	30
% Trans max	31	30	30	39	43	90

. *Courbe de croissance* : *N° 11.*



COURBE DE CROISSANCE N°II : Corynebacterium diphteriae 330



COURBE DE CROISSANCE N°IO : Listeria monocytogenes 2II6

GERME : *Pseudomonas aeruginosa 725 IPL.*

. *Milieu* : Peptone 5 g/l, NaCl 5 g/l.

. *Contrôle* : Bacille gram-négatif, morphologie, pousse, mobilité, pigmentation.
Oxydase +, nitrates + (anaéro), glucose + (oxydatif) protéolyt +, lipolyt +.

. *Besoins nutritifs* : Faibles. Pousse en milieu ordinaire.

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	PP	TS	PH	TH	PR	T
T Lat	2	2	2	2	2	2,15
T Max	9	10	11	11	11,30	12
% Trans max	0	0	0	0	0	0

. *Courbe de croissance* : *N° 12.*

GERME : *Moraxella Lwoffi 8427 IPL.*

. *Milieu* : Peptone 5 g/l, NaCl 5 g/l.

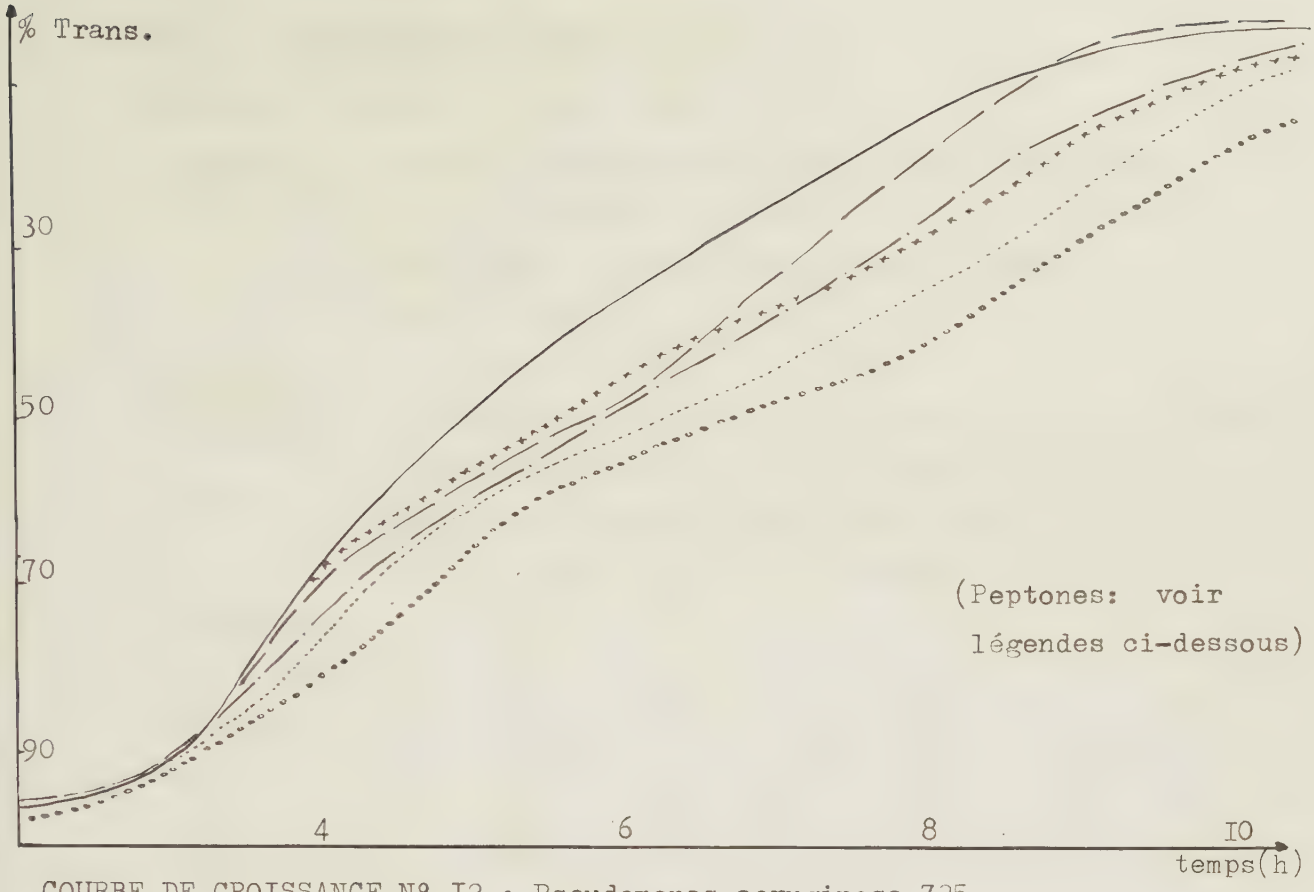
. *Contrôle* : Bacille gram-négatif, immobile, morphologie, culture, oxydase -, aérobie strict. Négativité de tous les tests de fermentations sucrées.

. *Besoins nutritifs* : Pousse en milieu ordinaire. Ne demande aucun facteur de croissance (97 bis) (P. Baumann J.bact. 1968, 95 : 58 - 73).

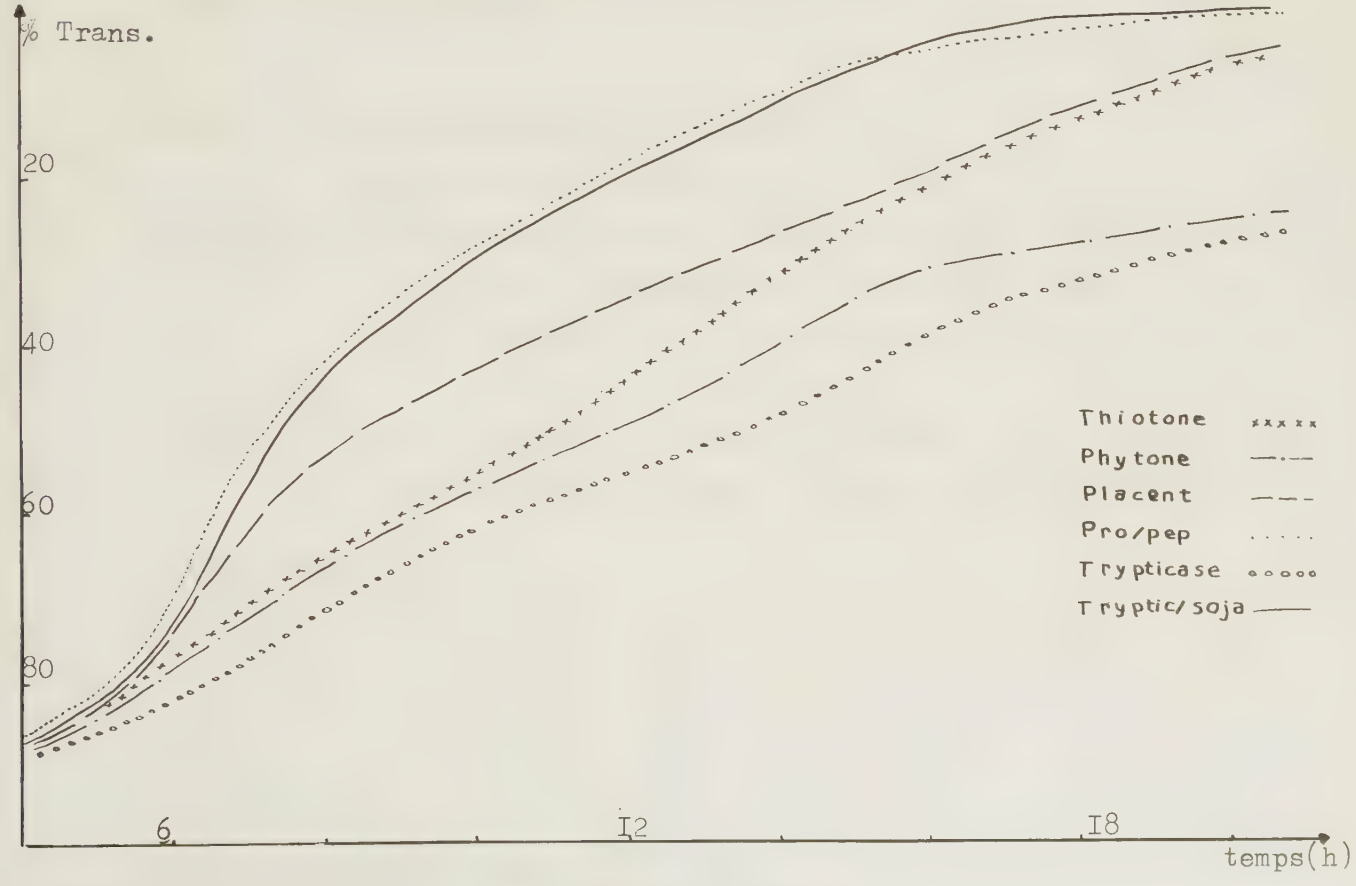
. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	TS	PR	PP	TH	PH	T
T Lat	4	4	4	4	4	4
T Max	19	19	22	22	22	22
% Trans max	0	0	0	0	25	25

. *Courbe de croissance* : *N° 13.*



COURBE DE CROISSANCE N° I2 : Pseudomonas aeruginosa 725 .



COURBE DE CROISSANCE N° I3 : Moraxella Lwoffi

GERME : *Lactobacillus casei 8263.*

. *Milieu* : Peptone 20 g/l, NaCl 5 g/l.

. *Contrôle* : Bacilles gram-positif, morphologie, culture (pas de pousse sur gélose ordinaire), gel -, coag. lait + (4 j.), glu^{+}, lev^{+}, $mann^{+}$, gal^{+}, $malt^{+}$, $lact^{+}$.

. *Besoins nutritifs* : Très exigeant : ac. pantothénique, ac. folique, riboflavine, biotine, pyridoxine, ac. lipoïque, arginine, guanine, xanthine, uracile, K^{+}, Mg^{++}, Mn^{++}. Pousse faible en eau peptonée.

. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	TS	PP	PH	TH	T	PR
T Lat	5,15	5	5,30	25	13	5
T Max	22	13	35	37	27	20
% Trans max	32	60	61	67	72	79

. *Courbe de croissance* : *N° 14.*

GERME : *Lactobacillus helveticus 8262.*

. *Milieu* : Peptone 20 g/l, NaCl 5 g/l.

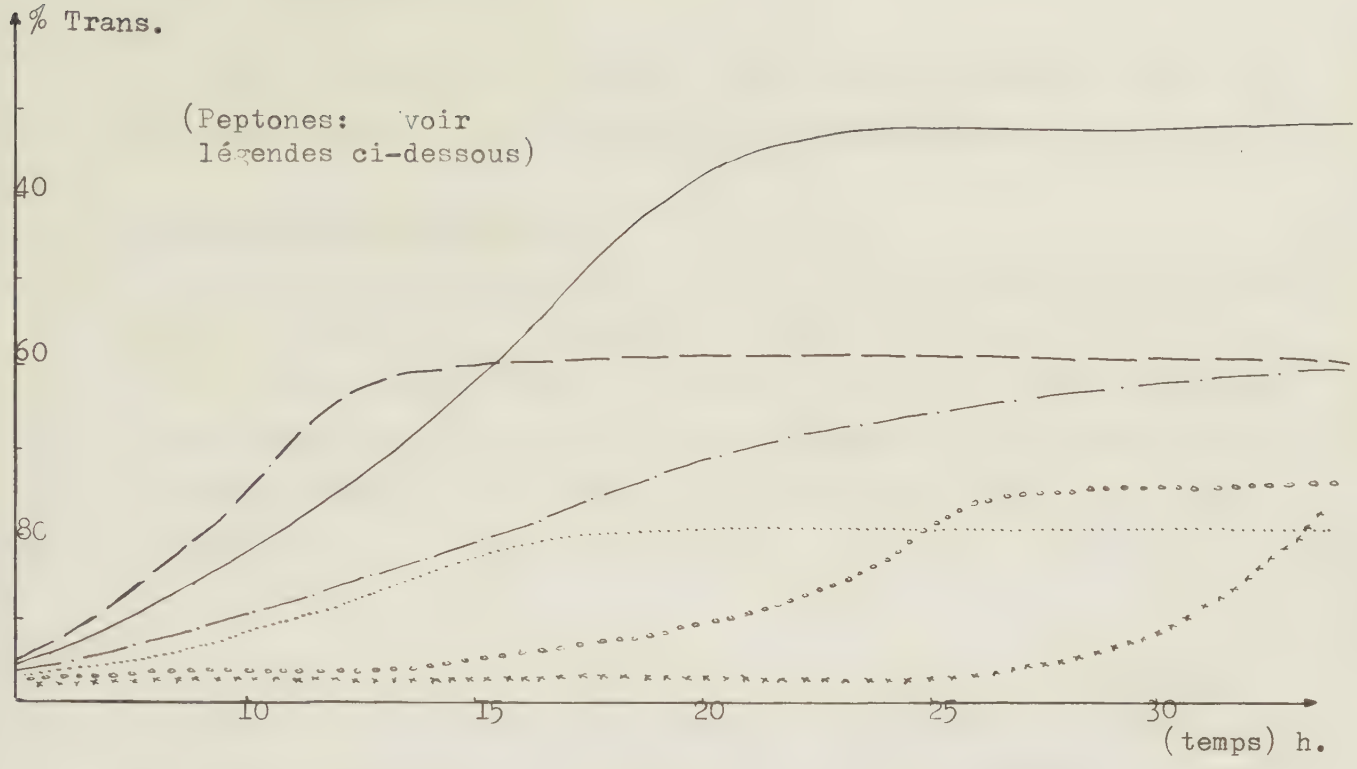
. *Contrôle* : Bacilles gram-positif, morphologie, culture (pas de pousse sur milieux ordinaires), gel-, coag. lait ++, Glu +, lèv +, lact +, malt +, mann +.

. *Besoins nutritifs* : Très exigeant comme la plupart des lactobacilles, mais exigences particulières en pyrimidines (101).

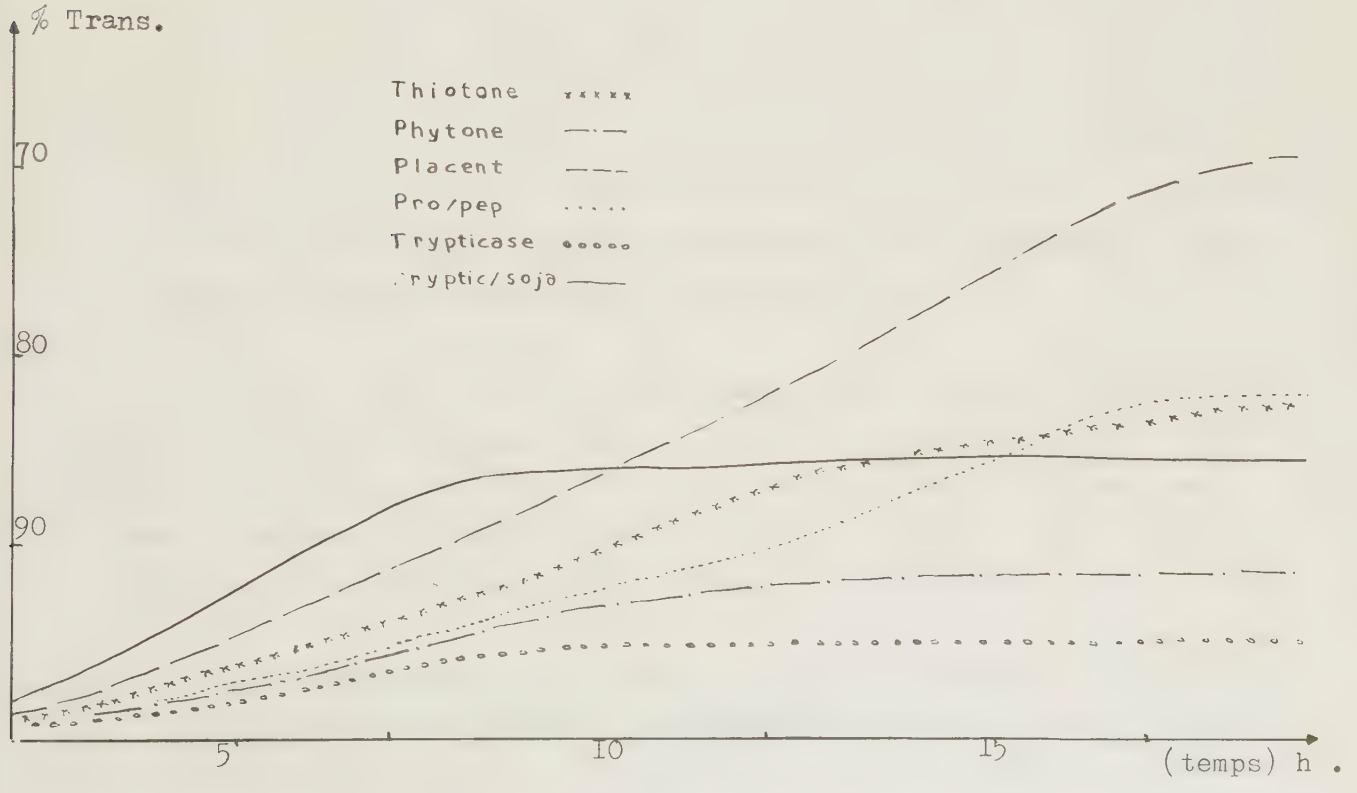
. *Expérience* :

Ordre d'arrivée	1	2	3	4	5	6
Peptones	PP	TH	PR	TS	PH	T
T Lat	2	2	2	2	2	2
T Max	19	18	21	9	14	9,30
% Trans max	70	81	82	86	91	95

. *Courbe de croissance* : *N° 15.*



COURBE DE CROISSANCE N° I4 : Lactobacillus casei 8263 .



COURBE DE CROISSANCE N° I5 : Lactobacillus helveticus

1.2.1.3. Commentaires.

Les conclusions de cette série d'essais portant sur les différents germes sont multiples, et intéressent :

- les peptones en général :

. les germes peu exigeants (E. coli, P. aeruginosa, S. typhi) nous ont donné des résultats pratiquement identiques à ceux qu'on avait obtenu avec le germe - test, S. aureus. On peut donc considérer que le taux de croissance de ce germe donne une estimation valable de la qualité nutritive lobale des peptones.

. les germes exigeants ont donné des résultats extrêmement différents, puisqu'on a vu arriver en première position : la trypticase-soja (L. casei), la protéose peptone (N. meningitidis), la thiotone (B. abortus), la phytone (S. pneumoniae), la Bpplacentaire (P. multocida, C. diphteriae). Seule, la trypticase, sans doute en raison de sa pauvreté en facteurs de croissance a constamment donné des résultats très médiocres. Il conviendrait donc, en toute rigueur, de retenir pour chaque germe la peptone qui lui correspond, opération inapplicable, bien sûr, en laboratoire d'analyse, mais de toute première importance pour les productions industrielles de faible volume (antigènes) ou d'importance plus grande (toxine diphtérique, fermentations).

Il est difficile de déterminer quels germes exigeants devraient être retenus pour un contrôle approfondi de la qualité nutritive d'un lot, d'autant plus que les réponses peuvent être extrêmement variables d'un lot à l'autre - pour notre préparation comme pour les produits commerciaux.

La seule espèce qui nous ait paru à peu près insensible à la qualité de la peptone est Brucella abortus, qui a présenté

une courbe de croissance très plate et très régulière (voir les coordonnées de la courbe), même pour la tryptose, milieu pourtant recommandé à cet usage par le laboratoire fabricant. Résultat d'autant plus surprenant que plusieurs auteurs avaient signalé la présence de substances fortement inhibitrices à l'égard de ce germe dans certaines peptones (148).(Il est vrai cependant que nous n'avons pu travailler sous atmosphère d'anhydride carbonique).

Il nous parait, de toute façon indispensable, pour tester un milieu de culture destiné aux bactéries pathogènes, de réaliser des courbes de croissance portant, au moins, sur une souche de :

- Staphylocoque,
- Streptocoque hémolytique ou de pneumocoque,
- Méningocoque,
- Entérobactérie,
- Lactobacille,
- Corynébactérie.

Il serait souhaitable que les souches à utiliser soient standardisées, comme c'est le cas des souches utilisées pour les dosages microbiologiques des vitamines.

- La peptone placentaire :

Nous avons résumé dans le tableau (X) . ce que nous avons appelé "ordre d'arrivée" des six peptones (correspondant au maximum de pousse obtenu avec chaque germe), puis additionné les totaux. Il est bien évident que la valeur d'un tel mode de représentation est toute relative, puisque les classements seraient probablement différents si l'on avait utilisé d'autres germes, et même d'autres souches. De plus ce classement reflète le point extrême des courbes de croissance et non leur intégralité.

Constatons, cependant, que notre préparation obtient la moyenne la meilleure, devançant même la trypticase-soja,

AEROBIES : ORDRE D'ARRIVEE CUMULE DES PEPTONES

PEPTONES	PR Prot. Pep.	TS Try. Soja	PP Placent.	TH Thiotone	PH Phytone	TR Trypticase
Germes-test						
St. aureus	5	1	2	3	4	6
Str. pneumon.	4	3	2	5	1	6
Str. faecalis	5	1	3	4	2	6
N. meningitid.	1	4	2	3	5	6
N. sicca	5	2	3	4	1	6
Esch. coli	3	1	2	4	5	6
S. typhi	4	1	2	3	5	6
B. abortus	3	5	2	1	4	-
P. multocida	3	4	1	2	5	6
H. parainflu.	4	3	I	5	2	6
L. monocyto.	3	I	2	4	5	6
C. diphteriae	2	3	I	4	5	6
P. aeruginosa	5	2	I	3	4	6
M. Lwoffi	2	I	3	4	5	6
L. casei	6	I	2	4	3	5
L. helveticus	3	4	I	5	2	6
TOTAL	58	37	30	58	58	89
Total/I6	3	2	I	3	3	6

COMPARAISON DES PEPTONES SUR LES I6 SOUCHES AEROBIES TESTEES .

(Tableau X)

polypeptone d'une qualité pourtant excellente.

Elle s'est révélée supérieure aux autres produits commerciaux pour la pousse d'Haemophilus para-influenzae, de Pasteurella multocida et de Corynebacterium diphteriae.

Pour aucun germe, elle n'a présenté d'augmentation anormale du temps de latence, ni de résultats médiocres, puisqu'elle arrive, la plupart du temps, en première ou en seconde position. Ceci nous confirme ce que les analyses chimiques et le dosage des facteurs de croissance nous avaient appris : son équilibre en acides aminés et en vitamines en fait un milieu de toute première qualité.

1.2.2. Germes anaérobies.

Prévot et Taffanel, on l'a vu, ont utilisé le bouillon pepsique de placenta humain pour la culture des anaérobies(129). Rappelons qu'ils en avaient déduit la supériorité du milieu ainsi préparé sur le classique bouillon viande-foie.

Il convenait de vérifier ces travaux, d'autant plus que la peptone placentaire, préparée par une technique différente, possède une composition qui lui est propre.

Examinons d'abord les conditions de base de cette étude.

1.2.2.1. Choix du germe test.

Les germes suivants, dont les souches proviennent de la collection du Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur de Lyon (*), ont été retenus :

Ordre	Famille	Germe
Micrococcales	Micrococcaceae (G+)	Streptococcus anaerobius
Bacteriales	Ristellaceae (G-)	Ristella pseudoinsolita
	Clostridiaceae(G+)	Welchia perfringens
		Clostridium sporogenes
Actinobacteriales	Actinobacteriaceae (G+)	Corynebacterium anaerobium
		" parvum
		Bifidobacterium bifidus

Ces germes semblent assez représentatifs de la flore anaerobie, et englobent des espèces communes fréquemment rencontrées en pathologie humaine. Plectridium tetani, et surtout Clostridium botulinum n'ont pas été testés, en raison du danger présenté par leur culture.

Pour chaque germe, nous n'avons retenu que quelques références bibliographiques. On consultera avec profit l'ouvrage bien connu de A. R. Prévot (130), qui, outre des études très complètes de chaque germe, abonde en références, classées par années de parution.

1.2.2.2. Choix du milieu de culture.

On a préparé, à partir de la peptone placentaire et de la peptone viande-foie, des eaux peptonées ordinaires à 20 g/l salées à 5 g/l seulement pour la peptone placentaire, la peptone VF présentant une concentration suffisante en chlorure de sodium.

(*) Nous remercions Madame le Docteur Guillermet, Chef du Service de microbiologie à l'Institut Pasteur de Lyon, qui nous a procuré les souches et nous a aidé dans ce travail.

1.2.2.1. *Choix du germe test.*

Les germes suivants, dont les souches proviennent de la collection du Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur de Lyon (*), ont été retenus :

Ordre	Famille	Germe
Micrococcales	Micrococcaceae (G+)	Streptococcus anaerobius
Bacteriales	Ristellaceae (G-)	Ristella pseudoinsolita
	Clostridiaceae (G+)	Welchia perfringens
		Clostridium sporogenes
Actinobacteriales	Actinobacteriaceae (G+)	Corynebacterium anaerobium
		" parvum
		Bifidobacterium bifidus

Ces germes semblent assez représentatifs de la flore anaerobie, et englobent des espèces communes fréquemment rencontrées en pathologie humaine. Plectridium tetani, et surtout Clostridium botulinum n'ont pas été testés, en raison du danger présenté par leur culture.

Pour chaque germe, nous n'avons retenu que quelques références bibliographiques. On consultera avec profit l'ouvrage bien connu de A. R. Prévot (130), qui, outre des études très complètes de chaque germe, abonde en références, classées par années de parution.

1.2.2.2. *Choix du milieu de culture.*

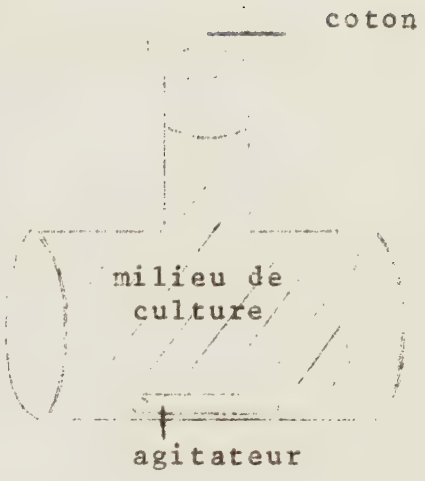
On a préparé, à partir de la peptone placentaire et de la peptone viande-foie, des eaux peptonées ordinaires à 20 g/l salées à 5 g/l seulement pour la peptone placentaire, la peptone VF présentant une concentration suffisante en chlorure de sodium.

(*) Nous remercions Madame le Docteur Guillermet, Chef du Service de microbiologie à l'Institut Pasteur de Lyon, qui nous a procuré les souches et nous a aidé dans ce travail.

1.2.2.3. Choix de l'appareillage.

Le problème était d'assurer au milieu des conditions d'anaerobiose convenables. Problème très simplement résolu de par la forme des cuves du biophotomètre enregistreur :

celles-ci, remplies jusqu'à l'encolure, ne présentent qu'une surface de contact très faible avec l'air, par rapport à leur volume.



Les milieux répartis sont régénérés 20 minutes dans l'eau bouillante, et ensemencés à l'aide d'une pipette Pasteur suréffilée. Dans ces conditions, on peut observer une croissance très rapide des anaérobies, même en présence d'une forte agitation.

Nous n'avons trouvé qu'un seul antécédent à cette méthode, pourtant d'une simplicité exemplaire, dans les travaux de Faguet, (51) qui l'utilisa pour la croissance de Clostridium sporogenes.

Examinons maintenant les résultats obtenus ; nous avons davantage insisté sur les besoins nutritifs de ces germes, moins connus que ceux des bactéries aérobies.

GERME N° 1 : *Streptococcus anaerobius*.

. *Contrôle microscopique* : Cocci gram-positif en longues chainettes.

. *Pousse* : Grumeleuse, mais régulière.

. *Besoins nutritifs* : Mal connus mais identité sérologique avec les streptocoques du groupe D (130).

. *Courbe de croissance* : *N° 16.*

GERME N° 2 : *Ristella pseudoinsolita*.

. *Contrôle microscopique* : Bacilles gram-négatif droits ou un peu incurvés, isolés ou en petits amas, asporulés, immobiles.

. *Pousse* : Lente et régulière. Faible.

. *Besoins nutritifs* : Exigence absolue en hème (132), non remplaçable par le fer, ni par les substances réductrices. Mais il n'exige ni vitamine, ni acides aminés. Cependant, il y a une stimulation de croissance grâce à pro, gly, ac. glu, ser, hist, ala, cyst. (133).

. *Courbe de croissance* : *N° 17.*

. *Résultats* :

Germe	S. anaero		Ris. pseudoins	
Ordre d'arrivée	1	2	1	2
Peptones	PP	VF	PP	VF
T Lat	3	3	2	2
T Max	21	21	15	20
% Trans max	23	26	50	54

GERME N° 3 : *Clostridium sporogenes*.

. *Contrôle microscopique* : Bacilles gram-positif, droits, isolés, par paires ou courtes chainettes. Très mobiles.

. *Pousse* : Très rapide. Odeur putride (32).

. *Besoins nutritifs* : Premier anaérobie cultivé sur milieu synthétique : Faguet (51), Fugioka (56), Campbell (30). Exigences en : acides aminés (Arg, phénylala, tyr, val, isoleu), biotine, sels minéraux, oligoéléments (Ni^{++}, Co^{++}). Développement meilleur sur milieu contenant des protéines peu dégradées ou des produits d'hydrolyse partielle.

. *Courbe de croissance* : *N° 17*.

. *Résultats* :

Ordre d'arrivée	1	2
Peptones	PP	VF
T Lat	6	6,15
T Max	9,30	10
% Trans max	0	0

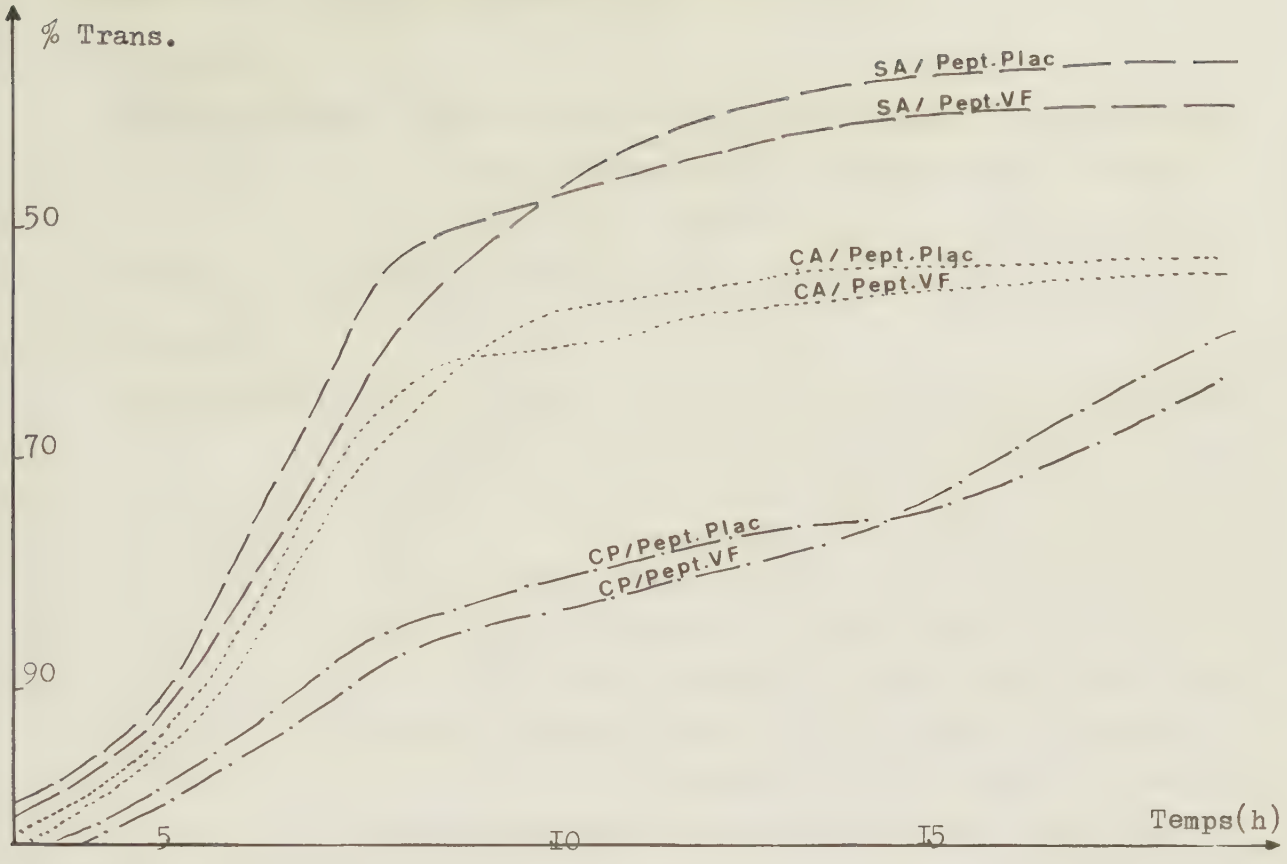
GERME N° 4 : *Bifidobacterium bifidus*.

. *Contrôle microscopique* : Bâtonnets gram-positif à extrémités renflées, bifides, isolés ou par paires, immobiles, asporulés.

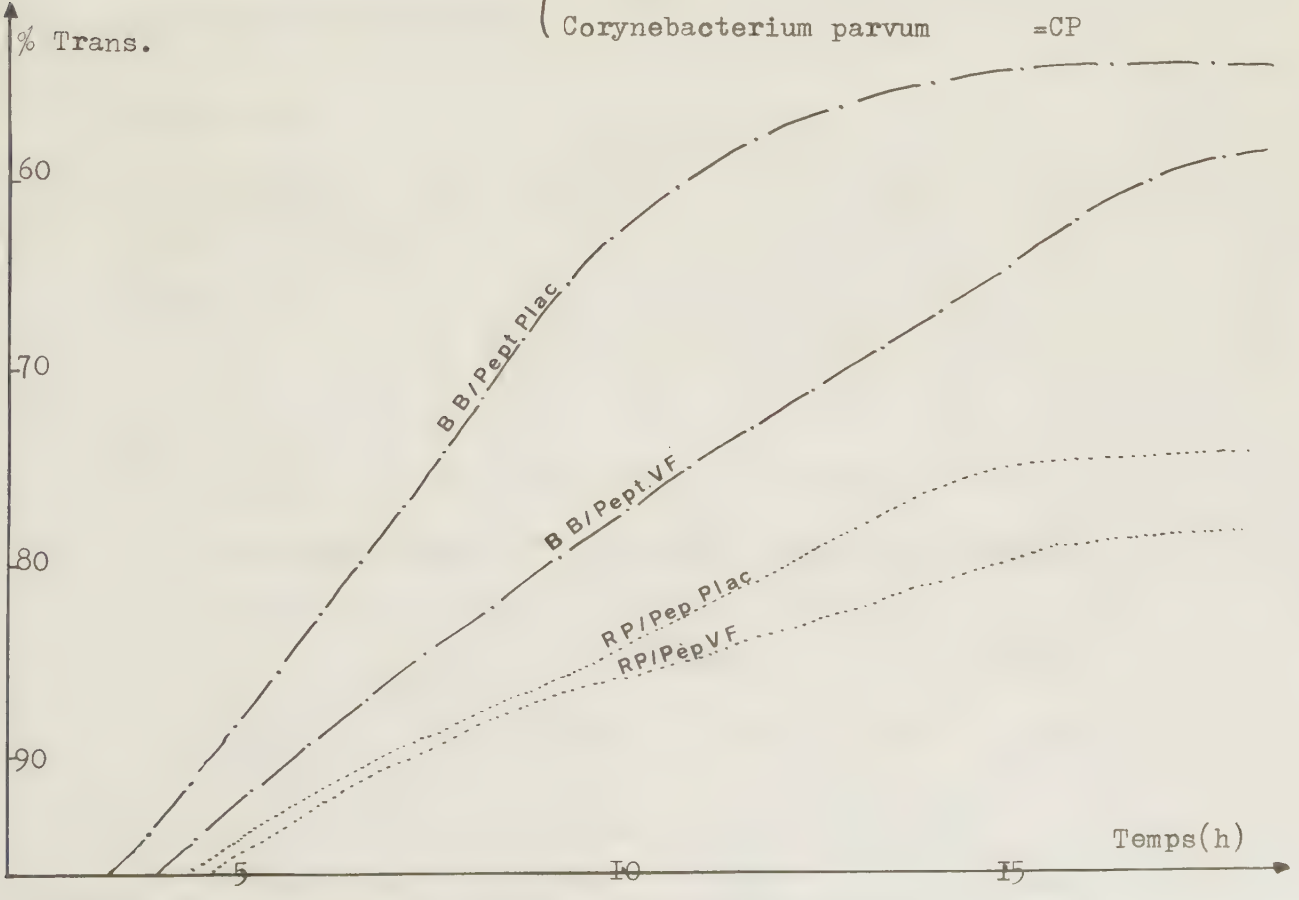
. *Pousse* : Homogène, mais lente et faible (50 p. 100 de transmission).

. *Besoins nutritifs* : Très exigeant : Petuely (127), Raynaud (141). Exigences en cystine (ou cystéine), biotine, acide panthoténique, "facteur bifidus" (155) proche de la streptogenine, éléments minéraux (Fe^{+++}, Mg^{++}, Mn^{++}). Certaines souches demandent la riboflavine, d'autres des bases puriques et pyrimidiques.

. *Courbe de croissance* : *N° 16*.



COURBE DE CROISSANCE N ° I6 : { Streptococcus anaerobius =SA ; Corynebacterium anaerobius =CA ; Corynebacterium parvum =CP }



COURBE DE CROISSANCE N° I7 : { Bifidobacterium bifidus = B B ; Ristella pseudoinsolita = R P }

GERME N° 5 : *Welchia perfringens* (*3 souches*).

. *Contrôle microscopique* : Bâtonnets droits gram-positif à extrémités subcarrées, isolés ou en courtes chaines, immobiles, asporulés.

. *Pousse* : Trouble abondant, odeur faible.

. *Besoins nutritifs* : Très exigeant : il ressort des travaux de Boyd (23), Webb (169), Shankar (151), Fuchs (55), Runova (144), qu'il demande : 14 acides aminés (ala, arg, ac. asp, cyst, ac. glu, hist, leu, isoleu, méth, phénylala, thréo, trypto, tyr, val), des chlorures minéraux (NH_4^+, Mg^{++}, Fe^{+++}, Na^+, K^+), des facteurs de croissance (adenine, biotine, panthoténate de calcium, pyridoxine). La pousse est influencée par l'équilibre entre les acides aminés du milieu. Sur milieu privé de peptone, on trouve des formes anormales, non toxigènes.

. *Courbes de croissance* : *N° 18 et 19.*

. *Résultats* :

1ère expérience

Souches	WP 1		WP 2		WP 3	
Ordre d'arrivée	1	2	1	2	1	2
Peptones	PP	VF	PP	VF	PP	VF
T Lat	2,30	3,30	2,30	4,30	2,30	4
T Max	7,15	8	7,30	11	9	9
% Trans max	0	0	0	0	0	10

2ème expérience : *2 ensemencements différents*.

	WP 1 fort		WP 1 faible	
Ordre d'arrivée	1	2	1	2
Peptones	PP	VF	PP	VF
T Lat	2	2	2	-
T Max	7	7,30	7,15	-
% Trans max	0	0	0	90

GERMES N° 6 et 7 : *Corynebacterium parvum*
Corynebacterium anaerobium

. *Contrôle microscopique* : C. parvum : bâtonnets gram-positif, fins avec renflements et coloration bipolaire.
C. anaerobium : bâtonnets gram-positif à morphologie de bacille diphtérique. Plus épais que le précédent.

. *Pousse* : Lente, assez faible, homogène, sans odeur.

. *Besoins nutritifs* : Peu de références. Germes d'actualité :

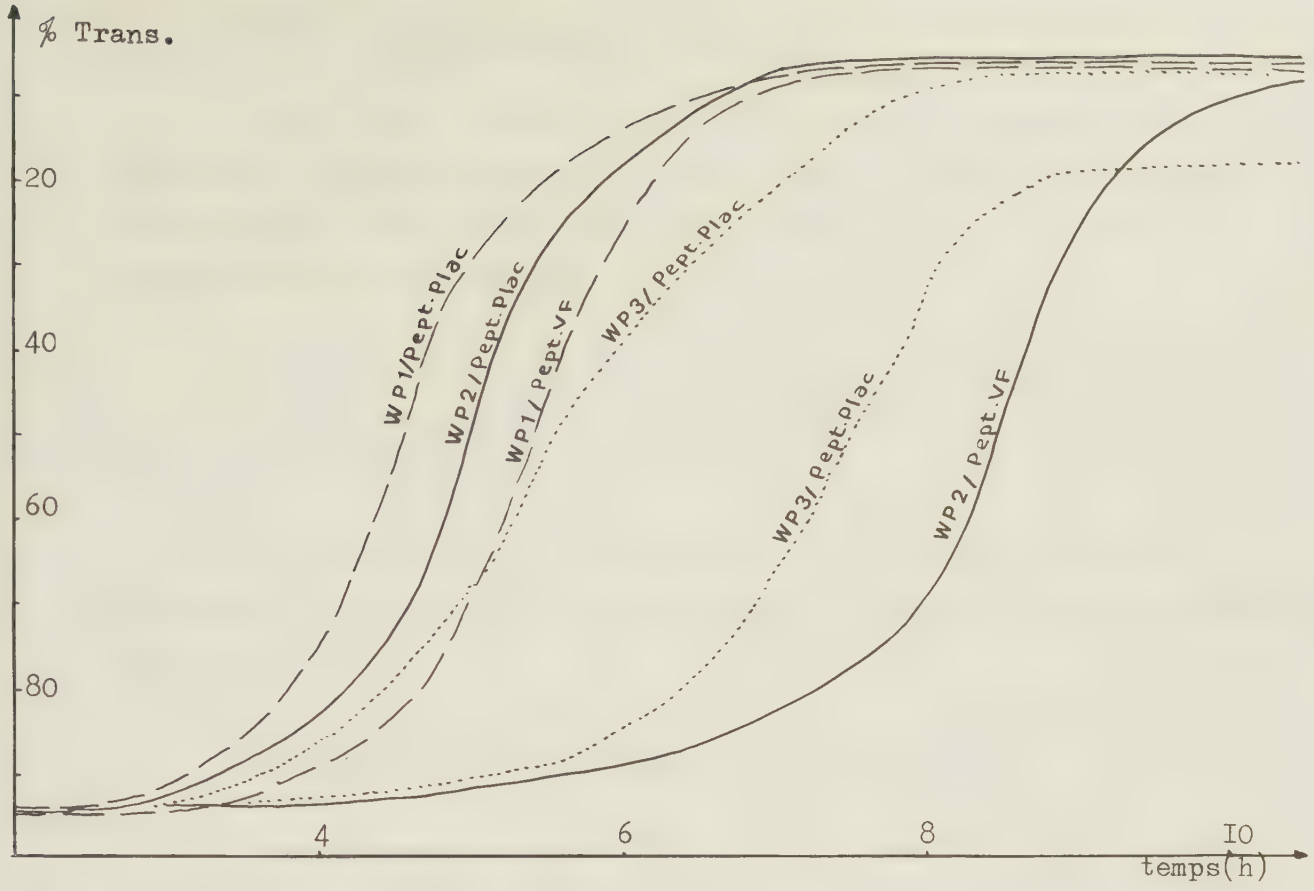
C. parvum : stimulation sur le système réticulo-endothélial comparable à celle que provoquent les mycobactéries.

C. anaerobium : agent de la lipodystrophie intestinale (maladie de Whipple), de découverte récente (130).

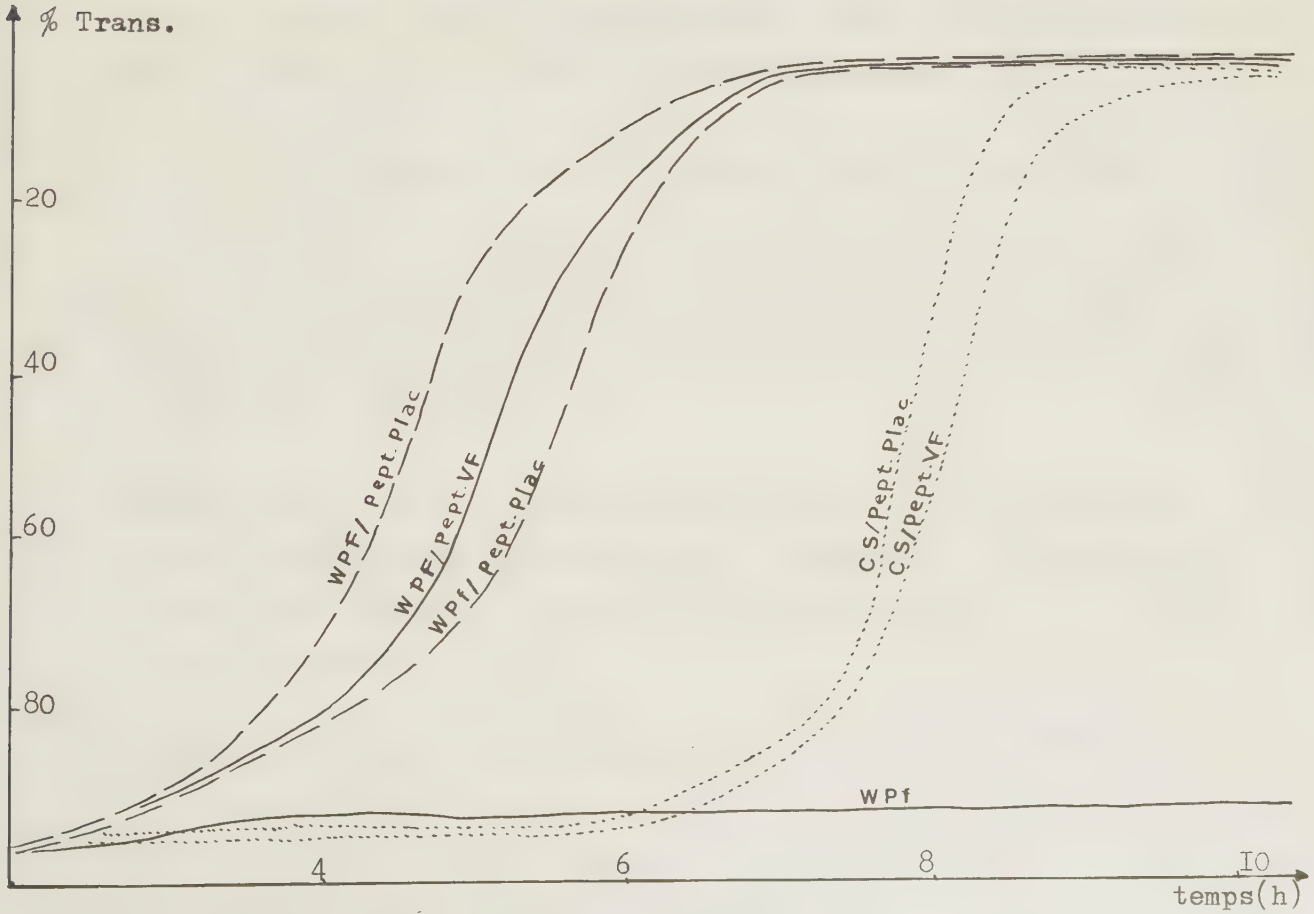
. *Courbe de croissance* : *N° 18.*

. *Résultats* :

	Bifidus		C. parvum		C. anaero.	
Ordre d'arrivée	1	2	1	2	1	2
Peptones	PP	VF	PP	VF	PP	VF
T Lat	2	2	2,30	2,30	2	2
T Max	16	20	22	20	14	16
% Trans max	50	45	42	41	41	43



COURBE DE CROISSANCE N° I8 : Welchia perfringens (3 souches)



COURBE DEBCROISSANCE N° I9 : Clostridium sporogenes
Welchia perfringens(ensemencement faible WP f
" fort WP F)

1.2.2.4. Commentaires: anaérobies.

L'étude que l'on vient de faire nous a confirmé entièrement les observations de Prévot, puisque notre préparation a supplanté le bouillon viande-foie pour tous les germes anaérobies qu'on a testés.

Nous avons même vu qu'avec un faible ensemencement de W. perfringens, seule la peptone placentaire permettait d'obtenir une pousse.

La supériorité de ce milieu sur la peptone la plus couramment utilisée pour les anaérobies est donc particulièrement flagrante.

1.3. COMMENTAIRES SUR L'ETUDE COMPARATIVE.

Si cette étude nous a bien mis en évidence la valeur de notre préparation, on peut constater qu'il est très difficile d'en tirer une information, quelle qu'elle soit, sur les relations pouvant exister entre la composition d'une peptone et son pouvoir nutritif à l'égard des germes testés.

La bibliographie nous a confirmé ces observations :

- Bernard (15) a observé que "le taux d'azote aminé/azote total varie dans des proportions importantes, et cette variation n'est absolument pas parallèle à la valeur bactériologique des produits".

- Meyer (105), utilisant diverses réactions des protéines pour le dosage de peptones, n'a pu établir de rapport avec la pousse de souches de Salmonelle typhi et de Micrococcus pyogenes.

- Patzwaldt (119) n'a, de même, pas observé de corrélation

entre le taux d'azote aminé et la croissance de plusieurs souches de Shigella.

- La meilleure preuve que l'on puisse fournir que l'augmentation du taux d'aminoacides libres n'est pas significative est que les produits hautement dégradés (hydrolysats acides à azote aminé atteignant 40 p. 100) ont un pouvoir nutritif extrêmement faible, comme l'a également constaté Bernard (14).

De tout ceci, il convient donc de tirer les conclusions suivantes :

- La valeur d'une peptone bactériologique, voire de tout aliment azoté destiné à cet usage, ne peut être déterminé par ses caractères physicochimiques ; il conviendra donc de faire appel à une évaluation microbiologique.

- Le degré de dégradation ne reflète pas la qualité nutritive, qu'on a tort de ramener, la plupart du temps, aux composés protéiques. Il convient de ne pas oublier qu'une peptone est un mélange extrêmement complexe de protéoses, acides aminés, facteurs de croissance, d'oligoéléments, et que c'est de ce délicat équilibre que dépend sa valeur alimentaire.

2 - *ETUDE COMPARATIVE DES ESSAIS MICROBIOLOGIQUES GENERAUX*

Il s'agit à présent de déterminer l'aptitude de notre préparation à être utilisée dans la pratique bactériologique, en particulier dans les milieux de culture courants destinés à la réalisation des tests biochimiques.

Pour cette étude, nous avons repris les préparations commerciales utilisées précédemment. Rappelons qu'il s'agit de :

Protéose peptone 3	- abréviation :	PR
Trypticase	- " :	TR
Phytone	- " :	PH
Thiotone	- " :	TH
Viande-foie	- " :	VF
Peptone placentaire	- " :	PPLm (lot moyen)

2.1. *ESSAIS DES PHARMACOPEES.*

2.1.1. *Production de l'indole.*

Il a été préparé des solutions à 0,1 p. 100 dans l'eau distillée des 5 peptones du commerce et du lot PPLm. Elles ont été ensemencées avec E. coli 819 (125).

La lecture s'opère après 24 heures à l'étuve à 37°, à l'aide du réactif de Kovacks (31).

Peptone	PR	TR	PH	TH	VF	PPLm
Indole	+	+	+	+	±	+

La réaction est, pour notre préparation, constante et très positive, ce qui n'a rien de surprenant vu l'importance de son taux de tryptophanne.

2.1.2. *Glucides fermentescibles.*

Les solutions des mêmes peptones ont été préparées à deux concentrations différentes et additionnées de rouge de phénol après ajustement du pH. Ensemencement avec Escherichia coli 819 et lecture après 24 et 48 heures d'incubation à 37° par virage au jaune de l'indicateur (125).

Peptones	PR	TR	PH	TH	VF	PPLm
à 2 %	-	-	++	±	-	-
à 1 %	-	-	+	-	-	-

Constatons, ce que tous les auteurs soulignent, que les peptones végétales contiennent des sucres, ce qui les rend impropres aux tests microbiologiques de fermentation des glucides.

Pour notre préparation, on observe parfois un virage après les premières heures de culture, mais un retour à la coloration initiale après 24 heures. La négativité de ce test est importante, car on avait craint une éventuelle décomposition soit de l'adjuvant de broyage des placentas (la cellulose), soit des mucopolysaccharides placentaires, au cours de la préparation.

2.1.3. *Production d'hydrogène sulfuré.*

Les solutions gélosées des dix peptones à 1 p. 100 ont été ensemencées par piqûre, avec Proteus mirabilis, l'indicateur incorporé au milieu étant le sous acétate de plomb (31). On a obtenu les résultats suivants :

Peptones	PR	TR	PH	TH	VF	PPLm
SH 2	-	+	+	++	±	+

On note que la thiotone, utilisée d'ailleurs à cette

fin, a permis une production de SH_2 particulièrement importante, due à sa richesse en méthionine. Il en va de même pour notre préparation qui, on l'a vu, renferme une forte proportion de cet acide aminé.

2.1.4. *Hémolyse sur gélose sang.*

Nous avons préparé des milieux de culture contenant 2 p. 100 de peptone, 0,5 p. 100 de chlorure de sodium et 1,5 p. 100 de gélose dans l'eau, additionné de 5 p. 100 de sang de lapin. Ces milieux, coulés en boites de Pétri, ont été ensemencés avec un pneumocoque et un streptocoque hémolytiques.

Après 24 heures, nous avons observé sur toutes les boites dez zones d'hémolyse caractéristique. Il semble donc que la peptone n'ait pas d'influence sur ce phénomène.

2.1.5. *Pousse de Neisseria gonorrhoae.*

Les milieux de culture ont été réalisés comme précédemment, mais additionnés de 10 p. 100 de sang et chauffés à 80-90° jusqu'à obtention d'une teinte chocolat. Après ensemencement avec Neisseria gonorrhoae (souche faculté de Pharmacie) et incubation 48 heures en atmosphère d'anhydride carbonique, nous avons observé une pousse sur :

Peptones	PR	PH	TH	TR	VF	PPLm
Pousse	+	+	+	-	-	+

Remarquons cependant qu'une telle appréciation est délicate puisque les pharmacopées ne précisent pas si les colonies doivent présenter un diamètre minimum ou seulement être visibles.

2.2. AUTRES ESSAIS.

2.2.1. Production d'uréase.

Les solutions de peptones ont été ensemencées avec Proteus mirabilis. On procède à deux passages sur eau peptonée à 15 g/l avant repiquage sur le milieu gélosé urée-indole de l'Institut Pasteur (15).

Les germes cultivés en présence des différentes peptones ont tous produit de l'uréase.

Dans ces conditions, le milieu urée-indole vire au rose franc après quelques heures à 37°.

2.2.2. Milieu de Clark-Lubs.

Les réactions du rouge de méthyle et de Voges-Proskauer, utilisées quotidiennement en bactériologie, se devaient d'être réalisées. Nous avons utilisé pour cela un classique milieu de Clark-Lubs (31).
Celui-ci a été ensemencé avec :

Klebsiella pneumoniae : germe RM^- VP^+
Proteus mirabilis : germe RM^+ VP^-

Les solutions des peptones testées ont été comparées avec le milieu Clark-Lubs de l'Institut Pasteur.

2.2.2.1. Réaction de Voges-Proskauer.

La lecture s'opère après 48 heures à l'étuve à 37°, par addition d'une solution alcoolique d'α naphtol, et de potasse diluée.

Peptones	PR	TR	PH	TH	PPLm	I.Pasteur
Kleb.	+	+	+	+	+	+
Prot.	-	-	-	-	-	-

Tous les milieux ont permis la production d'acétylméthylcarbinol signant la dégradation du glucose par Klebsiella pneumoniae.

2.2.2.2. *Réaction du rouge de méthyle*.

La lecture s'opère après 4 jours d'incubation à 37° avec une solution hydroalcoolique de cet indicateur coloré.

Peptones	PR	TR	PH	TH	PPLm	I.Pasteur
Kleb.	-	-	-	-	-	-
Prot.	+	+	+	+	+	+

La réaction est donc conforme à la normale, pour toutes les préparations. A noter que ces deux tests se sont toujours montrés très positifs avec la peptone placentaire, alors que le milieu de l'Institut Pasteur a parfois donné des colorations faibles.

2.2.3. *Production de pigments*.

La formation de pigments en milieux peptonés solides et liquides a été étudiée sur 3 germes : Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa et Serratia marcescens.

La pigmentation du staphylocoque à 20° en milieu solide n'a pas montré de différence sensible selon la peptone utilisée. Il n'en est pas de même pour les deux autres germes.

2.2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*.

L'apparition des pigments du bacille pyocyanique en fonction de la peptone a été étudiée par Lambin (1961) et Darbois (1970).

Les solutions peptonées à 20 p. 100 salées à 5 p. 100

ont été ensemencées avec une souche de 24 heures de P. aeruginosa prélevé, sur milieu solide.

La lecture a été effectuée après 2, 4 et 8 jours d'incubation :

- La pyocyanine est extraite par le chloroforme qui se colore en vert bleu.

	PR	TR	PH	TH	VF	PPLm
2 jours	+	-	+	+	-	+
4 jours	+	+	++	+	-	++
8 jours	+++	+++	++	++	++	+++

- La pyoverdine insoluble dans le chloroforme donne une fluorescence verte dans la phase aqueuse en milieu alcalin.

	PR	TR	PH	TH	VF	PPLm
2 jours	-	+	-	-	-	-
4 jours	+	+	++	++	+	+
8 jours	++	++	++	++	+	++

Le pigment s'est donc formé en quantité importante. Nous aurons d'ailleurs l'occasion de revenir longuement sur le bacille pyocyanique pour la production d'hémolysine.

2.2.3.2. Serratia marcescens.

La pigmentation due à la prodigiosine, (173) (174) a été étudiée :

- En milieu solide : la peptone placentaire produit une coloration très intense, de couleur plus cramoisie que celle obtenue avec les autres peptones.

- En milieu liquide, on a observé la coloration obtenue en

surface après 24 heures :

Peptones	PR	TR	PH	TH	PPLm
Pigments	-	+	-	++	++

La préparation placentaire semble donc tout-à-fait apte à la production de pigments.

2.2.4. *Test de la bactériostase*.

De nombreux auteurs ont étudié l'influence de la peptone sur la détermination de l'activité bactériostatique et bactéricide des antiseptiques et des antibiotiques.

Citons ainsi Brewer (26), Benoist (11), Wolf (173), Weuffen (171), Mikio Amaha (106), Ikeda (74), Bernard et Lambin (14) (16).

D'une manière générale, ces chercheurs ont constaté que la variation de l'activité bactériostatique était fonction de la qualité nutritive des peptones, donc qu'un milieu de culture pauvre donnait une inhibition plus grande, ce qui n'a rien de surprenant.

Nous avons choisi d'aborder cette question par son aspect le plus pratique, qui est l'antibiogramme en milieu gélosé, plutôt que par les essais en milieu liquide, plus rares et d'un intérêt plus faible.

Pour cela, on a réalisé deux séries de milieux gélosés, salés à 5 p. 100 et peptonés à 15 p. 100, à pH 7,2, à l'aide de trypticase soja (peptone utilisée à l'Institut Pasteur pour la préparation des milieux de Mueller-Hinton) et de notre préparation.

Selon le procédé habituel, nous avons, après avoir sélectionné au préalable les antibiotiques auxquels les germes

étudiés étaient sensibles, mesuré les diamètres d'inhibition produits par ces substances.

A titre d'exemple, nous reproduisons les diamètres d'inhibition obtenus sur les géloses après ensemencement par notre germe-test, Staphylococcus aureus 101 et pose des disques standard (Institut Pasteur) chargés d'antibiotiques.

Diamètres d'inhibition en centimètres

	Pep/plac (PPLm)	Trypt/soja
Chloramphénicol	2,6	2,5
Tétracycline	2,5	2,5
Gentamicine	2,3	2,2
Streptomycine	2,1	2
Céphalotine	2,95	2,95
Pristinamycine	2,7	2,7

Donc des diamètres strictement identiques, parfois même très légèrement supérieurs pour la peptone placentaire, qui s'avère donc tout-à-fait apte à la réalisation de tels milieux.

3 - *DOSAGES DES FACTEURS DE CROISSANCE* . (✳)

Certains auteurs (12) (21) avaient souligné le taux vitaminique élevé du tissu placentaire. Il fallait donc vérifier si notre mode de préparation avait conservé ou altéré ces précieux facteurs de croissance.

Le dosage microbiologique des facteurs vitaminiques a fait l'objet de travaux innombrables depuis trente ans, même en ce qui concerne les peptones (34).

Long et délicat, mais d'une précision incomparable, c'est le seul mode de dosage valable pour certaines vitamines (acide folique, B_{12}).

Il va de soi que nous ne pouvons traiter cette question que sous une forme très résumée. Pour de plus amples détails, en particulier en ce qui concerne les germes tests et les milieux de culture, on se reportera avec fruit à la collection "Vitamins" (167) où ces problèmes sont exposés avec un maximum de clarté, et à l'ouvrage de Snell (154).

3.1. *PRINCIPE DES DOSAGES.*

- Les méthodes microbiologiques sont basées sur l'observation que certains microorganismes ont besoin de vitamines spécifiques pour leur croissance. En utilisant un milieu de base complet à tous égards, sauf pour la vitamine à doser, les réponses de croissance du microorganisme test sont comparées quantitativement à une gamme standard et aux solutions inconnues.

- Les conditions de base sont donc les suivantes :

  . disposer d'un microorganisme à développement nul en l'absence de la substance à doser.

  . extraire éventuellement le facteur de croissance afin qu'il soit présent sous une forme utilisable par la

(✳) Nous remercions Madame Karlin, Chef du Service des Vitamines à l'Institut Pasteur de Lyon, pour l'aide qu'elle nous a apportée dans la réalisation et la rédaction de ce travail.

bactérie.

. obtenir une proportionnalité entre le développement du germe et la vitamine à doser (79).

- La lecture s'effectue :

. soit par turbidimétrie : c'est le cas de tous les dosages que nous avons eu à effectuer.

. soit par acidimétrie (particulièrement pour les bactéries lactiques). Les essais ont été effectués sur le lot moyen de peptone (PPLm) en solution dans l'eau distillée.

3.2. *DOSAGES DES PRINCIPAUX FACTEURS DE CROISSANCE.*

3.2.1. *Vitamine B 1.*

- Extraction : on procède à une hydrolyse acide à chaud par HCl N/10 (la thiamine reste stable sans diminution de son activité à pH 3,5), complétée par l'action enzymatique de la takadiastase.

- Dosage microbiologique : le germe test est Lactobacillus viridescens (ATCC 12706) ; on utilise un milieu complet (tryptone, extrait de levure vitamin-free, complément vitaminique, glucose et sels minéraux) servant à réaliser la gamme étalon de chlorhydrate de thiamine. L'incubation s'opère à 30°, pendant 18 heures (méthode Deibel).

Valeur moyenne trouvée pour le lot PPLm : 1,34 µg/g.

3.2.2. *Vitamine B 2.*

- Extraction : elle s'opère également par hydrolyse acide avec HCl N.

Toutes les opérations s'effectuent à la lumière rouge,

en raison de la très grande photosensibilité de cette vitamine et à pH inférieur à 7, car elle est détruite à pH alcalin.

- Dosage microbiologique : il s'effectue en présence d'une gamme étalon de riboflavine. Le germe test est Lactobacillus casei (ATCC 7469). Le milieu de base se compose de peptone et extrait de levure riboflavin-free, complément vitaminique, dextrose, cystéine et sels minéraux. L'incubation s'opère à 37° pendant 36 heures (méthode Snell et Strong) (154).

  Valeur moyenne trouvée pour le lot PPLm : 5,4 µg/g.

3.2.3. *Vitamine B 6.*

- Extraction : réalisée par hydrolyse acide (HCL 0,055 N) durant 4 heures à 120°.

- Dosage microbiologique : il s'effectue en présence d'une gamme étalon de chlorhydrate de pyridoxine. Le germe test est Saccharomyces carlsbergensis (ATCC 9080) qui répond aux trois formes de Vitamine B 6 (pyridoxine, pyridoxal et pyridoxamine). Le milieu de base est très complexe et composé essentiellement de sels minéraux, glucose, solution de vitamines, tampon citrate, hydrolysat de caséine et acides aminés. L'incubation dure 20 heures à 30° (méthode Atkin).

  Valeur moyenne trouvée pour le lot PPLm : 0,81 µg/g.

3.2.4. *Vitamine B 12.*

- Extraction : par libération aqueuse à chaud : chauffage 10 minutes à 120° en présence d'une solution de KCN dans un tampon acide acétique-acétate M/10 afin de transformer la totalité de la vitamine B 12 en cyanocobalamine plus résistante au chauffage.

- Dosage microbiologique : il s'effectue en présence d'une gamme de cyanocobalamine. Le germe test est Lactobacillus leichmannii (ATCC 7830). Le milieu de base est un milieu spécial Difco. L'incubation dure 36 heures à 39° - 40°.

Valeur moyenne trouvée pour le lot PPLm : 0,020 µg/g.

3.2.5. *Acide folique*.

La recherche s'effectue à l'état de folates libres à l'aide de Lactobacillus casei et d'une gamme standard d'acide ptéroyl-glutamique. Le milieu de culture est un milieu spécial des laboratoires BBL. L'incubation s'opère à 37°, durant 18 heures.

Valeur moyenne trouvée pour le lot PPLm :
0,19 µg/g de folates libres.

3.2.6. *Acide pantothénique*.

Recherché sous forme libre, sans extraction, à l'aide de Lactobacillus plantarum (ATCC 8104) et d'une gamme étalon d'acide pantothénique. Le milieu de base est complexe (hydrolysat de caséine, dextrose, sels minéraux, complément vitaminique et acides aminés). L'incubation s'opère pendant 36 heures à 30° (méthode Skeggs et Wright).

Valeur moyenne trouvée pour le lot PPLm : 2,6 µg/g.

3.2.7. *Niacine*.

- Extraction : s'effectue par hydrolyse acide à chaud par HCl N.

- Dosage microbiologique : est pratiqué en présence d'une gamme étalon de Niacine. Le germe test est également Lactobacillus plantarum. Le milieu de culture, donc, est à peu près le même que pour l'acide pantothénique. L'incubation s'opère 36 heures à 30°.

Valeur moyenne trouvée pour le lot PPLm : 28,0 µg/g.

3.2.8. *Méthionine libre.*

Cet acide aminé essentiel en microbiologie, a été recherché par Leuconostoc mésenteroïdes à l'aide d'une gamme de méthionine. Le milieu spécial Difco est un mélange de tous les acides aminés sauf la méthionine. L'incubation s'opère 36 heures à 37°.

Valeur moyenne trouvée pour le lot PPLm : 11,7 mg/g.

3.3. *CONCLUSION.*

Ces analyses étant complexes et surtout très couteuses, nous avons, on l'a vu, limité cette étude au lot moyen de peptone placentaire.

Nous avons établi un tableau des valeurs trouvées en facteurs de croissance, comparativement à trois des produits commerciaux testés au cours de ce travail. Les valeurs ont été relevées dans le catalogue des laboratoires BBL (9).

La composition des autres peptones ne nous est pas connue.

	Phytone	Thiotone	Trypticase	PP. Placentaire (PPLm)
Vit. B 1	0,19	+	+	1,34
Vit. B 2	0,43	1,9	0,575	5,4
Vit. B 6	0,4	0,32	0,006	0,81
Vit. B 12	0,000115	0,05	0,045	0,020
Acide folique	0,081	0,117	0,067	0,19
Ac. pantothénique	0,76	0,89	0,22	2,6
Niacine	3,3	21,2	0,8	28

(Valeurs en µg/g).

Constatons que notre préparation renferme tous les facteurs de croissance nécessaires aux microorganismes les plus exigeants, en quantité généralement supérieure aux autres produits commerciaux, élément extrêmement favorable que confirment les courbes de croissance microbiennes, et qui prouve bien que notre méthode de préparation est apte à conserver au milieu de culture ses éléments les plus fragiles et les plus précieux.

E - PRODUCTION DE TOXINES ET ENZYMES BACTERIENS /

Ayant démontré les qualités microbiologiques de notre peptone, il nous restait à tester son aptitude à la production de toxines et d'enzymes :

"La toxinogénèse, écrivait Smith en 1937, est sous la dépendance totale des constituants azotés du milieu. (...) La supériorité des peptones pepsiques sur les peptones pancréatiques est sur ce point démontrée". (166).

Les études postérieures devaient confirmer ce phénomène ; c'est la raison pour laquelle l'emploi de la protéose-peptone est si souvent recommandé par les auteurs; c'est d'ailleurs cette peptone qui nous servira le plus fréquemment de référence.

Nos travaux ont porté sur deux sortes de toxines :

- Les hémolysines.

Sous ce vocable, une série de substances excrétées par des espèces très différentes peuvent être regroupées. Dans le cas présent, la seule propriété commune des hémolysines que nous avons étudiées,est l'aptitude à hémolyser les érythrocytes de lapin. Nous les avons recherchées chez les cocci gram-positif (staphylocoque, steptocoque, pneumocoque), et chez les bacilles gram-négatif (Pseudomonas). Nous avons surtout insisté sur la staphylolysine (α toxine) et la streptolysine O, pour lesquelles nous avons cherché à définir les conditions de production idéales.

La diversité des propriétés de ces substances nous a obligé à faire précéder leur étude d'un très bref rappel bibliographique.

- Les hyaluronidases.

On peut définir ces substances plus aisément en raison de la similitude de leur action sur le collagène : diminution très rapide de la viscosité des mucoprotéines due à la dépolymérisation d'un substrat spécifique, l'acide hyaluronique (53).

Nous les avons recherchées chez le staphylocoque, le streptocoque et le pneumocoque, en raison de leur intérêt immunologique, puisque ces substances sont capables de provoquer l'apparition d'anticorps spécifiques.

Les méthodes de dosage que nous avons utilisées sont celles de l'Institut Pasteur de Lyon, basées sur l'activité enzymatique de la hyaluronidase sur un excès connu du substrat.

1 - *ENZYMES ET TOXINES STAPHYLOCOCCIQUES* .

1.1. *PRODUCTION DE STAPHYLOLYSINE*.

1.1.1. *Rappel*.

Quatre principales hémolysines sont sécrétées par certaines souches de staphylocoques pathogènes, et sont dénommées alpha, bêta, delta, et gamma. Rappelons très brièvement que :

- *L'alpha hémolysine ou staphylolysine*, qui est l'enzyme dont nous recherchons la production, est active sur les hématies de lapin à 37°. Elle est léthale et dermonécrotique. C'est une exotoxine protéique, thermostable et antigénique ; elle provoque la formation d'anticorps neutralisant son pouvoir hémolytique. Enfin, sa production par une souche donnée est étroitement liée à son pouvoir pathogène chez l'homme.

- *La bêta hémolysine* a une activité hémolytique sur les globules rouges de mouton à 4°, est léthale pour le lapin, antigénique, et semble également en relation avec la pathogénéicité du germe (172).

- *La delta hémolysine* a un large spectre d'hémolyse (érythrocytes humains, en particulier). Elle est leucotoxique et antigénique.

- *La gamma hémolysine*, moins connue, est leucotoxique et dermonécrotique.

1.1.2. *La staphylolysine*.

L'intérêt de sa production réside, d'une part, dans la possibilité de la transformer en anatoxine par l'action combinée de la chaleur et du formol, et d'autre part, dans

son utilisation comme réactif de laboratoire lors du titrage des anticorps anti α - hémolysine (ASL). Sa purification a été très étudiée (38) (77).

1.1.2.1. Choix du germe-test.

Diverses souches ont été testées. On a retenu la souche Wood 521 (en l'absence de la souche de référence Wood 46 que nous n'avons pu nous procurer) et la souche Touchebeoeuf, provenant d'un malade qui détient, à notre connaissance, le record national en antistaphylolysine, avec un taux de 200 unités/ml de sérum.

1.1.2.2. Choix de la technique.

Les études précédentes ont mis en évidence l'action favorable du CO_2, d'une bonne aération, (86), de certains acides aminés, (39), et enfin de quantités sub-léthales d'antibiotiques (95).

C'est l'action stimulante de la pénicilline que nous avons choisi de vérifier afin d'améliorer notre production d'alpha hémolysine,en nous conformant à la technique récente de Hallander (69). Notons cependant que l'influence de la pénicilline sur la stimulation de l'activité hémolytique des streptocoques est un fait établi depuis fort longtemps (160).

. Milieu de culture :

Extrait de boeuf Difco	:	0,3 %
Peptone	:	1 %
Chlorure de sodium	:	0,3 %
Eau distillée	:	QSP

Ajustement à pH 7,4 - autoclavage 20 mn à 110°.

. Conditions opératoires :

Le germe, cultivé 18 heures sur gélose au sang, est prélevé sur la pente de la gélose ; remis en suspension dans l'eau physiologique. Sa densité optique est ajustée à 90 unités (Labospac) à 650 nm, puis on répartit 0,3 cc de cette suspension dans des flacons de 60 cc, contenant 10 cc du milieu de culture additionné de 0,01 et 0,03 unités de Pénicilline par ml, le flacon témoin n'en renfermant pas.

Ce faible volume permet d'obtenir une bonne aération et autorise une assez forte agitation :

Nous étudions ainsi l'influence :

- de la souche bactérienne,
- de l'agitation,
- de la pénicilline,
- de la peptone (placentaire ou protéose).

La culture s'effectue 18 heures à 37°, puis on centrifuge 15 mn à 5000 tours afin de prélever le surnageant.

1.1.3. Titrage de la staphylolysine.

L'essai hémolytique est effectué sur ce surnageant, dont on prépare des dilutions de 2 en 2 dans du sérum physiologique, sous un volume de 1 ml, puis on ajoute 0,5 ml d'une solution d'hématies de lapin à 2,25 p. 100. On ajoute dans chaque tube 2 ml de sérum physiologique.

Après incubation 20 mn à la température du laboratoire et centrifugation, la lecture s'opère au photomètre Lumétron à 550 nm, contre un blanc de tampon et un tube représentant 100 p. 100 d'hémolyse (0,5 ml de globules rouges dans 2 ml d'eau distillée).
Le dernier tube positif est celui qui renferme encore une hémolyse à 50 p. 100, ou demi-hémolyse.

1.1.4. *Discussion des résultats* (tableau XI).

Les valeurs hémolytiques obtenues ont été extrêmement variables, malgré les précautions opératoires et l'emploi de conditions strictement identiques.

Les résultats, consignés dans le tableau (XI), représentent les valeurs moyennes des différents essais.

Constatons que :

- L'influence de l'agitation est déterminante, puisque le titre obtenu en son absence est nul ou très faible.
- La pénicilline, si elle semble avoir eu une influence stimulante sur la souche Touchebeouf, a provoqué à la même concentration une action inhibitrice sur la souche Wood.
- La peptone parait avoir un effet beaucoup plus régulier, surtout en ce qui concerne notre préparation. Elle permet d'atteindre des valeurs élevées (1/64), supérieures à celles obtenues avec le milieu à la protéose-peptone.

SOUCHE	PEPTONE	PENICILLINE u/ml	AGITATION + = avec − = sans	DILUTIONS SURNAGEANT PUR	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
TOUCHE BOEUF	PROT. PEP.	0	+	450	430	330				
			−	0						
		0,01	+	500	475	320				
			−	0						
		0,03	+	500	500	500	500	470		
			−	500	500	320				
	PLACENT.	0	+	470	470	470	440	380	240	
			−	0						
		0,01	+	500	500	500	500	400	230	
			−	0						
		0,03	+	500	500	500	500	500	470	340
			−	0						
WOOD	PROT. PEP.	0	+	500	480	370	230			
			−	360	240					
		0,01	+	380	230					
			−	0						
		0,03	+	0						
			−	0						
	PLACENT.	0	+	520	500	500	470	300		
			−	500	470	410	260			
		0,01	+	440	440	400	320			
			−	0						
		0,03	+	0						
			−	0						

500 = Hémolyse totale

250 = 1/2 hémolyse

- Production de staphylolysine en fonction de la peptone et des conditions de culture - (Tableau XI)

1.2. PRODUCTION DE STAPHYLOHYALURONIDASE.

L'aptitude à la production de hyaluronidase est considérée depuis longtemps (149) comme étant en rapport avec la virulence d'une souche staphylococcique.

Les études effectuées à ce sujet indiquent que cette production varie en fonction du milieu de culture, des conditions de culture, (température, temps, agitation) (134) (149), et de la présence éventuelle d'inhibiteurs spécifiques, notamment de traces métalliques (146).

Nous avons donc retenu les éléments suivants :

1.2.1. Choix de la souche.

On s'est adressé à la souche Wood 421, qui s'est révélée à l'examen être celle qui permettait la production la plus régulière.

1.2.2. Choix des conditions opératoires.

Nous avons conservé celles que nous venons de décrire, afin de tester parallèlement les activités enzymatiques.

Comme paramètres de la culture, nous avons retenu l'influence de l'aération, (culture en grand flacon), de l'agitation, et également de la pénicilline, puisque les auteurs ne signalent pas si son activité stimulante vis-à-vis du métabolisme de ce germe est effective en ce qui concerne la hyaluronidase.

1.2.3. Dosage de la hyaluronidase.

Elle a été titrée selon la méthode utilisée dans le service d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon.

L'unité turbidimétrique de hyaluronidase (turbidity reducing unit) a été définie comme étant la quantité d'enzyme qui, en 30 mn à 37°, réduit la turbidité donnée par 0,250 mg d'acide hyaluronique à la turbidité donné par 0,125 mg de cet acide, en présence de réactif aérique, dans les conditions d'application de la méthode.

Titrage :

Dans une galerie de tubes à essai contenant 0,50 ml de mélange tampon (0,1 M acétate de sodium - acide acétique, 0,15 M chlorure de sodium dans l'eau distillée pH = 6), on ajoute 1 ml de surnageant centrifugé du bouillon de culture dans le premier tube, puis l'on procède à des dilutions de 2 en 2 par passages successifs.

Au bain marie, on laisse s'établir dans les tubes une température de 37°, et on ajoute 0,250 mg d'acide hyaluronique (0,5 ml à 0,5‰). Après très exactement 30 mn de contact, on ajoute 4 ml de réactif sérique qui s'obtient en mélangeant une partie de sérum de cheval (dilué au 1/10 et amené à pH 3,1 par addition d'HCl) avec deux parties de mélange tampon (0,5 M acétate de sodium - 0,15 M de chlorure de sodium pH = 4,2). Celui-ci stoppe la réaction et donne un trouble en présence de l'acide hyaluronique, si celui-ci n'a pas été dépolymérisé.

Lorsqu'un tube présente une turbidité égale à la moitié de celle obtenue avec 0,250 mg d'acide hyaluronique, il y a une unité turbidimétrique.

1.2.4. *Discussion des résultats.*

Ils sont consignés dans le tableau (XII). Constatons que :

La pénicilline semble exercer une action néfaste sur cette production en inhibant la croissance du germe. Cependant, l'aération, et surtout l'agitation gardent une

Tableau XII

PEPTONE	AERATION	AGITATION	PENICILLINE (0,01 u/ml)	DILUTIONS SURNAGEANT PUR	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
PROTEOSE PEP.	+	-	-	150	200						
	+	+	+	50	90	140	200				
	-	+	-	30	100	180	200				
	-	-	+	20	30	50	130	170	200		
	-	+	+	40	40	40	40	40	60	130	190
PLACENTAIRE	+	-	-	200							
	+	+	+	50	110	180	200				
	-	+	-	130	180	200					
	-	-	+	20	30	60	130	170	200		
	-	+	+	20	30	50	70	120	170	200	

100 = 1/2 turbidité

- Production de staphylohyaluronidase par la souche Wood en fonction de la peptone et des conditions de culture -

importance primordiale, tandis que la peptone parait jouer un rôle plus faible que lors de la production de staphylolysine.

Les valeurs obtenues avec la protéose-peptone sont légèrement supérieures à celles que l'on obtient en utilisant notre préparation.

2 - *ENZYMES ET TOXINES STREPTOCOCCIQUES* .

2.1. *PRODUCTION DE STREPTOLYSINE O.*

2.1.1. *Rappel.*

La streptolysine O (SLO) est une des exoprotéines cellulaires sécrétées en anaérobiose et dans un milieu convenable par les streptocoques des groupes A, C, ou D de Lancefield.

Dans les milieux contenant des protéines sériques, est produite une autre hémolysine, la Streptolysine S, à propriétés léthales et immuno-dépressives, mais qui n'est pas antigénique (68).

Protéine hautement toxique, la SLO est connue essentiellement pour ses propriétés cytolytiques et cardiotoxiques, par son action sur la trame lipoprotéinique des membranes cellulaires (1). L'intérêt de sa production industrielle réside dans son utilisation dans les réactions immunologiques destinées au dépistage ou à la confirmation de certaines infections streptococciques,(les propriétés antigéniques de la SLO entrainant la formation d'anticorps antistreptococciques).

Cette toxine a été obtenue à l'état pur par Alouf, entre 1962 et 1967 (2) mais sa purification, difficile et onéreuse, reste un problème pour une production industrielle, puisque la méthode de Alouf, basée sur une alternance de chromatographies sur Sephadex et de relargages par le sulfate d'ammonium, ne comporte pas moins de treize étapes !

Notre objectif était donc, à partir d'une souche et d'un milieu adaptés, d'étudier l'influence de différentes peptones, dont la nôtre, sur la production de SLO.

2.1.2. *Choix de la souche*.

La SLO ne représentant, normalement sur des milieux simples que 0,02 p. 100 des exoprotéines excrétées par le Streptocoque (une vingtaine ont été identifiées), il convenait de sélectionner une souche produisant une forte proportion de SLO. Nous avons utilisé la souche de Streptococcus pyogenes A 78 de l'Institut Pasteur de Paris.

2.1.3. *Choix des conditions opératoires*.

Elles sont dictées par les propriétés spécifiques de l'enzyme.

2.1.3.1. *Milieu réducteur*.

La SLO est sensible à l'oxydation : l'air, l'eau oxygénée, l'iode l'inactivent irréversiblement ; elle n'est produite qu'en anaérobiose.

Ses propriétés hémolytiques et toxiques ne se manifestent qu'à l'état réduit ; pour ce faire, on la réactive à l'aide de substances réductrices : hydrosulfite de sodium, acide thioglycolique, chlorhydrate de cystéine.

D'où la nécessité de maintenir le milieu, tout au long de l'expérience, dans une relative anaérobiose ; nous avons utilisé, à cette fin, les cuves du biophotomètre comme nous l'avions fait lors de l'étude des anaérobies, mais sans procéder à un dégazage préalable, ce qui permettait d'entretenir en outre une agitation régulière et de suivre la croissance du germe.

2.1.3.2. *Température et temps*.

Très thermolabile, son activité diminue de moitié en 2 minutes à 50°, en 10 minutes à 45°, en 60 minutes à 37°.

Il est donc indispensable de stopper la culture dès que le titre en SLO atteint son maximum.

Avec un ensemencement convenable, Alouf a estimé ce temps à 8 heures (2). Au-delà, l'activité hémolytique diminue très sensiblement. La conservation s'effectue à l'état lyophilisé.

2.1.3.3. pH.

Il a peu d'influence, puisque la conservation de l'enzyme peut se faire entre 4,5 et 8,8. L'activité lytique est maximum à pH 6,8.

2.1.3.4. Inhibition de l'enzyme.

Certains lipides (cholestérol, stéroïdes) inactivent la SLO, tandis que certains métaux (mercure, cadnium, fer), ont un effet inhibiteur puissant, sans doute dû à la destruction des groupements SH, ainsi que certains polypeptides présents dans les peptones commerciales (153).

Par contre, et ceci est très controversé (68), l'addition de réducteurs, tels que la cystéine ou l'acide ascorbique au milieu de culture augmenteraient le titre en SLO (57).

Enfin, Alouf a établi que la production de streptolysine O évoluait parallèlement à la croissance, pendant les premières heures de la culture, avant que n'intervienne le processus de dégradation thermique.

Ces derniers points nous ont paru intéressants à vérifier, afin de tenter d'améliorer cette production difficile.

2.1.4. *Choix du milieu de culture.*

Trois milieux ont été successivement décrits par Alouf, dont les travaux nous ont servi de référence :

- le milieu A_1, dérivé du milieu de Walhl et Meyer (105), difficile à purifier en raison de la présense de produits de digestion de viande et de substances chromogènes.

- le milieu A_3, qui permet l'obtention d'une toxine plus pure, mais qui nécessite une longue préparation et demande, en particulier une dialyse prolongée (4 jours).

- le milieu A_2, retenu pour sa simplicité de préparation, et assurant un titre en SLO convenable, ainsi préparé :

Peptone pancréatique de viande	:	10 g
Peptone pepsique de viande	:	10 g
Extrait de levure	:	2 g
Eau distillée	:	860 ml

Ajustement à pH 7,8 (soude 10 N), puis addition de 100 cc de la solution :

$Na_2 HPO_4, 2 H_2O$	:	8,3 g
$KH_2 PO_4$	:	0,7 g
Eau distillée	:	100 ml

Stérilisation 120°, 30 mn, puis, à froid, addition de :

$NaHCO_3$ 10 % stérile	:	20 ml
Glucose 50 % stérile	:	20 ml

On observe une précipitation abondante lors de l'addition du tampon, puis lors de l'autoclavage, forte pour la

peptone pancréatique, faible pour la protéose-peptone et la peptone placentaire.
On l'élimine facilement par centrifugation et filtration.

2.1.5. *Expérience*.

Le milieu A_2 de Alouf étant constitué de l'association de deux peptones, nous avons réalisé des milieux ainsi conçus :

Peptones à tester :

- Peptone pepsique de viande (Réactifs)- abréviation : PEPS
- Peptone pancréatique de viande (Organotechnie) - abréviation : PANC
- Protéose-peptone (Difco) - abréviation : PRO-PEP
- Peptone placentaire - abréviation : PLAC

Associées ainsi :

1. PEPS + PANC
2. PEPS + PLAC
3. PANC + PLAC
4. PLAC + PLAC
5. PRO-PEP + PLAC
6. PRO-PEP + PRO-PEP

On répartit 10 ml de chaque milieu dans les cuves ; ils sont ensemencés avec 0,5 ml d'une culture de steptocoques A 78 de 18 heures remis en suspension dans l'eau physiologique de façon à obtenir une densité optique de 90 unités photométriques (Labospac).

Dans ces conditions, la croissance débute immédiatement sans phase de latence, ainsi que le recommande Alouf. Huit heures après, on retire les cuves du biophotomètre. Elles demeurent une nuit à + 4°. Le titrage est effectué le lendemain matin.

2.1.6. *Titrage de la streptolysine O.*

2.1.6.1. *Détermination de l'activité hémolytique totale.*

On réalise à l'aide du surnageant de culture une gamme de dilutions de 2 en 2, dans un mélange tampon, on répartit dans chaque tube 0,5 ml de suspension d'hématies de lapin à 2,25 p. 100.

Après une incubation de 45 mn à 37°, on effectue la lecture au Lumétron à 550 nm contre un blanc de tampon et un tube représentant 100 p. 100 d'hémolyse.

Une unité DH_{50} équivaut à la dilution correspondant à 50 p. 100 d'hémolyse donc à la moitié du tube témoin à 100 p. 100 d'hémolyse.

2.1.6.2. *Détermination de la dose hémolytique combinée.*

L'impossibilité d'obtenir un étalon de toxine pure fait que l'on est contraint de s'adresser à une antitoxine standard, ici le sérum Copenhague titrant 20 000 unités d'anti-SLO. A partir de ce sérum, on titre tous les autres.

La détermination de la dose LH_{50} est la quantité de SLO, qui, mélangée à une unité anti-SLO, est capable de provoquer la lyse de 50 p. 100 des hématies.

Elle s'effectue en deux étapes :

On incube le mélange toxine-antitoxine pendant 15 mn à 37° ; on ajoute 0,5 ml de suspension de globules rouges et on maintient 45 mn à 37°.
La lecture s'opère comme précédemment ; une unité LH_{50} est égale à la dilution qui donne 50 p. 100 d'hémolyse.

2.1.7. *Discussion des résultats*. (tableau XIII)

Les expériences portant sur les six milieux ont été effectuées dans les conditions suivantes :

A - Sans agitation,
B - Avec agitation,
C - Sans agitation avec addition de 1 p. 100 d'acide ascorbique,
D - Avec agitation avec addition de 1 p. 100 d'acide ascorbique.

Les résultats sont consignés dans le tableau (XIII) et les courbes de croissance correspondent aux essais B et D dans le graphique 12.

Il en ressort les points suivants :

- L'agitation, malgré la nécessité de l'anaérobiose, est un élément très important, puisque en son absence on obtient des DH faibles et des LH_{50} nulles (sauf pour le milieu composé uniquement de protéose-peptone).

- L'addition d'acide ascorbique aux milieux de culture exerce un effet protecteur certain sur la streptolysine O, effet qui est peut-être spécifique puisque elle provoque une augmentation du pouvoir de combinaison avec l'anticorps sans grande modification de l'activité hémolytique totale.

- Le choix de la peptone est l'élément principal de la production de streptolysine. Constatons sur les courbes de croissance que, outre l'absence recherchée de phase de latence, il y a concordance entre la pousse du germe et la production de streptolysine, du moins en l'absence d'adjuvant (acide ascorbique).

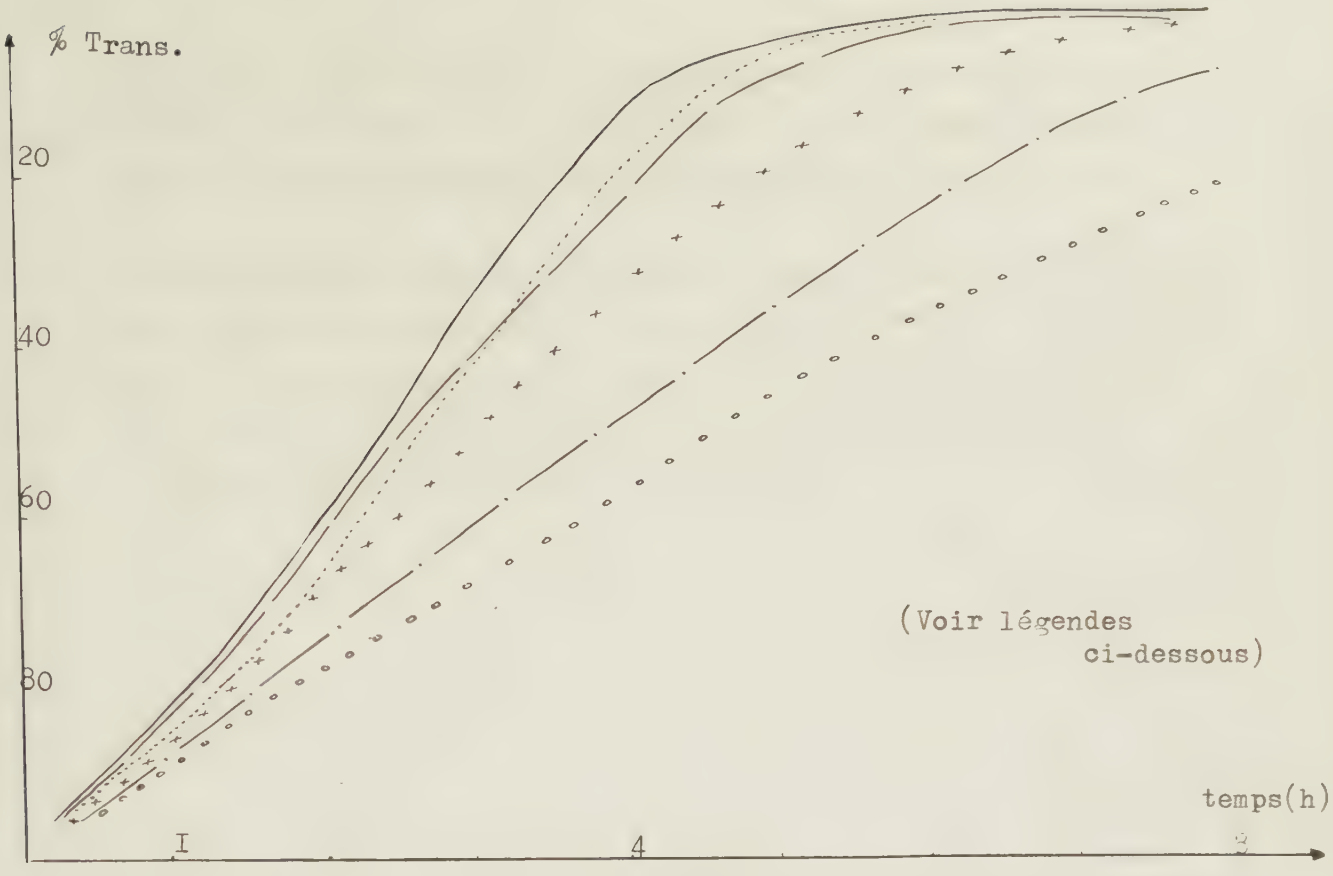
- La peptone placentaire a permis d'obtenir des rendements

PRODUCTION DE STREPTOLYSINE O .

	AGITATION		NON AGITE		AGITATION + VIT C 1 %		NON AGITE + VIT C 1 %	
Peptones	DH_{50}	LH_{50}	DH_{50}	LH_{50}	DH_{50}	LH_{50}	DH_{50}	LH_{50}
PANC PEPS	20	0	12	0	18	3	1	0
PANC PLAC	10	0	0	0	3	1	1	0
PEPS PLAC	32	3	0	0	20	5	3	0
PLAC PLAC	80	6,5	1 6	0	120	16	10	0
PLAC PRO PEP	90	7	0	0	60	7	7	0
PRO PEP PRO PEP	130	8	100	5	140	16	12	0

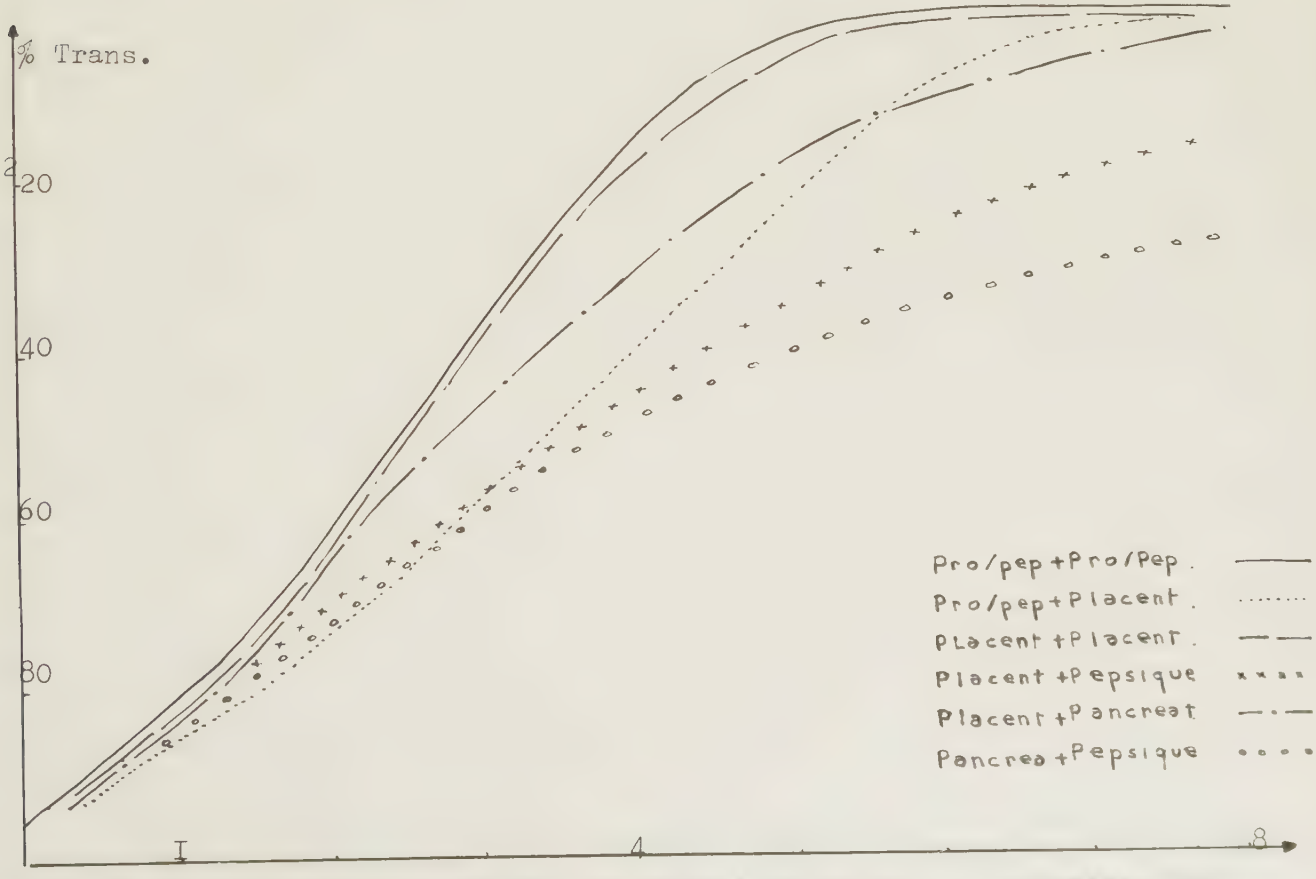
DETERMINATION DE L'ACTIVITE HEMOLYTIQUE (DH_{50}) ET DU TAUX DE SLO EN FONCTION DE LA PEPTONE UTILISEE, DE L'AGITATION ET DE LA PRESENCE DE VITAMINE C A 1 % DANS LE MILIEU.

- (Tableau XIII) -



COURBES DE CROISSANCE DE STREPTO.PYOGENES A 78:MILIEU A2 SANS VITAMINE C.
(Association de peptones)

(Graph.I2)



COURBES DE CROISSANCE DE STREPTO.PYOGENES A 78:MILIEU A2 +VITAMINE C I%.

légèrement inférieurs à la protéose-peptone, mais très supérieurs à ceux que l'on obtient avec les deux autres peptones habituellement utilisées pour cette production.

- Enfin l'utilisation de ces techniques a permis de retrouver la valeur maximale de 16 LH_{50} qu'avait obtenu Alouf (mais pas d'autres chercheurs ayant travaillé cette question à l'aide de ce même milieu), reflet d'une production très satisfaisante en steptolysine O.

3 - ENZYMES ET TOXINES PNEUMOCOCCIQUES .

3.1. PRODUCTION DE PNEUMOLYSINE.

3.1.1. Rappel.

Depuis leur découverte en 1901, de nombreuses recherches ont été effectuées sur les activités enzymatiques du pneumocoque, en particulier en ce qui concerne la production de l'hémolysine, vu les implications immunologiques de cette substance antigénique.

La pneumolysine se rapproche par certains caractères de la streptolysine O, mais s'en distingue par une moindre fragilité. Elle est sécrétée par environ 50 p. 100 des souches lors de leur isolement, mais cette propriété tend à disparaitre lors des repiquages.

Cette protéine est antigénique, et conduit à la formation d'anticorps spécifiques, bien qu'elle soit dépouvue de pouvoir pathogène (108). Sa formation nécessite les conditions suivantes :

3.1.1.1. Milieu réducteur.

Elle est inactivée rapidement par oxydation à l'air, mais d'une manière réversible. Elle n'est détruite que par une oxydation très poussée.

L'hémolysine oxydée se comporte comme une anatoxine ayant perdu son pouvoir hémolytique, tout en conservant son activité antigénique.

3.1.1.2. Température et temps.

Elle est détruite après 10 mn à 55° ou 3 mn à 55°,

mais résiste 3 heures à 37°, et ne voit son activité diminuer que faiblement à la glacière (143) (35).

Le titre hémolytique semble évoluer parallèlement à la croissance, passer par un maximum lors de la phase plateau (20 heures), pour ne décroitre ensuite que lentement.

La température la plus couramment utilisée est de 37°, bien que Cotoni (35) ait préconisé, dans un travail ancien, une culture à 33° afin d'empêcher une autolyse précoce.

3.1.1.3. PH.

Il convient de le choisir un peu alcalin (7,6 - 7,8) en raison de l'acidification provoquée par l'utilisation du glucose par la bactérie. D'autres sucres activent la croissance et la production d'hémolysine (saccharose, lactose, levulose), mais dans une proportion moindre (76).

3.1.2. Expérience.

3.1.2.1. Choix du milieu de culture.

Nous avons utilisé le "Bouillon tamponné glucosé pour la culture des streptocoques et des pneumocoques" de l'Institut Pasteur, favorable à la multiplication de ces bactéries et à la production de leurs antigènes spécifiques.

Formule :

Extrait de viande Liebig	:	5 g
Peptone spéciale	:	10 g
Chlorure de sodium	:	2,5g
Phosphate monopotassique	:	0,7g
Phosphate disodique	:	8,3g
Glucose	:	2 g
Eau distillée	:	1000 ml

PH = 7,6 - 7,8

Nous avons donc testé le bouillon commercial, et préparé deux autres milieux répondant à cette formule en utilisant la protéose-peptone et la peptone placentaire.

3.1.2.2. Choix de la souche.

On a utilisé la souche N° 918 de l'Institut Pasteur de Lyon.

Le germe, cultivé sur gélose sang, est émulsionné dans l'eau distillée après 18 heures à 37°, puis la suspension est ajustée à la densité optique optimale.

On répartit 0,5 ml de cette suspension dans 20 ml de bouillon de culture, dans des flacons de 60 ml.

Après 24 heures d'incubation, la culture est centrifugée afin de recueillir le surnageant.

3.1.2.3. Dosage de la pneumolysine.

Elle est réactivée à raison de 0,1 ml de chlorhydrate de cystéine pour 2 ml de surnageant pendant 15 mn.
Puis on effectue des dilutions de 2 en 2 sous un volume de 1 ml dans un tampon (celui qu'on utilisait lors du dosage de la streptolysine), les tubes sont portés 15 mn à 37°.

On rajoute alors 1 ml de tampon et 0,5 ml de suspension de globules rouges de lapin.

La lecture s'effectue après 45 mn d'incubation à 37°, par la recherche de la demi-hémolyse.

3.1.3. Résultats. (tableau XIV)

Les trois milieux testés ont permis d'obtenir un titre élevé en pneumolysine, dont la production semble donc peu dépendante de la peptone. La protéose peptone a permis d'obtenir une demi-hémolyse à une dilution plus forte.

3.2. PRODUCTION DE STREPTO ET PNEUMOHYALURONIDASE.

Il nous a semblé souhaitable de rechercher ensemble ces deux enzymes, semblables par leur action et produites par des germes voisins. Nous avons trouvé peu d'informations sur les propriétés de la hyaluronidase pneumococcique (52) (120) ; par contre, celle du streptocoque est plus connue, puisque le "spreading factor" des streptocoques hémolytiques a été signalé par Duran et Reynolds dès 1933, et que les études se sont poursuivies jusqu'à ce jour (53).

3.2.1. *Choix des souches.*

Les mêmes souches que précédemment ont été utilisées (Streptococcus pyogènes A 78 et Streptococcus pneumoniae 918). Les germes, cultivés sur gélose sang, sont émulsionnés dans l'eau distillée après 18 heures à 37° ; 0,5 ml de la suspension ajoutée à la densité optique voulue sont répartis dans 20 ml de bouillon de culture. Après 16 heures d'incubation pour le streptocoque et 24 heures pour le pneumocoque, la culture est centrifugée. Le dosage s'effectue sur le surnageant.

3.2.2. *Dosage.*

On a également utilisé la méthode mise au point à l'Institut Pasteur de Lyon, commune aux deux enzymes.

Le principe, les unités et le mode opératoire sont semblables au dosage de la staphylohyaluronidase. La lecture s'effectue dans les mêmes conditions.

3.2.3. *Résultats.* (*tableau XIV*).

Constatons les faibles taux obtenus avec le bouillon Pasteur, et l'avantage très net de notre préparation en pneumohyaluronidase. La production des deux enzymes (pneumolysine et pneumolyaluronidase) parait d'autre part se faire de manière indépendante, la peptone jouant ici un rôle important.

Dilutions surnageant	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Bouillon Pasteur	680	680	630	570	430	360	290	210	130
Pentone Placentaire	680	630	570	560	530	430	430	300	240
Protéose Pentone 3	680	530	530	500	470	430	360	330	210

Tableau XIV

DOSAGE DE LA SPERMOLYSINE

Hémolyse totale = 680

1/2 hémolyse = 340

Dilutions surnageant	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Bouillon Pasteur	130	180	230	250					
Pentone Placentaire	10	10	10	10	55	130	165	190	
Protéose Pentone 3	10	10	40	110	170	190	230		

Tableau XV

DOSAGE DE LA SPERMOLYSINE

Turbidité = 240

1/2 turbidité = 120

Dilutions surnageant	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Bouillon Pasteur	10	10	60	120	140	170	190		
Pentone Placentaire	10	10	10	30	110	130	150	190	
Protéose Pentone 3	10	10	10	20	100	110	170	200	

Tableau XVI

DOSAGE DE LA SPERMOLYSINE

Turbidité = 200

1/2 turbidité = 100

4 - *TOXINES ET ENZYMES DU BACILLE PYOCYANIQUE* .

4.1. RAPPEL.

On a démontré que le pouvoir pathogène de Pseudomonas aeruginosa était lié :

- A une toxine constituée d'un mélange de corps toxiques : une hémolysine, une protéase, une lécithinase.

- A un antigène muqueux péribacillaire.
  Lors des infections occasionnées par ce germe, il n'est pas rare d'observer des nécroses hémorragiques entourées d'une surface oedémateuse avec rougeur et induration, imputables, selon Liv (94), à l'hémolysine.

Nous avons tenté d'extraire cette toxine afin de réaliser sur le lapin des sérums hyperimmuns dans le but de mettre au point une vaccination anti-pyocyanique. Malheureusement, les résultats que nous avons obtenus n'étaient nullement significatifs : l'hémolysine ne parait pas avoir de propriétés antigéniques, malgré son pouvoir hautement pathogène, en particulier sur la souris.

Cependant, cette production a donné des résultats remarquables en ce qui concerne le rôle de la peptone.

4.2. CHOIX DE LA SOUCHE.

A partir des antigènes somatiques et flagellaire du Pseudomonas, on a pu établir une classification sérologique grâce aux travaux de Habs (66), puis de Verder et Evans (165), qui proposèrent en 1961 de définir 10 sérogroupes comportant 13 types différents.
Matsumato puis Muraschi (111) complétèrent cette classification.
Pour notre recherche, nous avons disposé de 11 types choisis dans la collection de l'Institut Pasteur de Lyon.

4.3. CHOIX DE LA TECHNIQUE.

Les milieux liquides ou semi-liquides donnant des résultats décevants, nous avons utilisé la technique de Liv.

. Milieu de culture :

Extrait de viande	:	3 g
Peptone (tryptone)	:	5 g
Glucose	:	1 g
Gélose	:	15 g
Eau distillée QSP	:	1000 ml.

Ceci étant le milieu de référence, nous avons préparé de la même manière des géloses-peptone placentaire.

. Production de l'hémolysine :

Le milieu est coulé dans une boite de pétri, solidifié, puis on tend sur la gélose un papier de cellophane ajusté, stérilisé au préalable à l'autoclave.

Deux gouttes de culture sont étalées sur le papier, et les boites sont incubées pendant 48 heures. La cellophane est ensuite lavée avec 5 ml d'eau physiologique et le produit récupéré est centrifugé à 4000 t/mn pendant 20 mn. L'hémolysine est séparée ensuite des germes d'une manière plus fine avec un filtre bactérien et le surnageant est utilisé directement pour les titrages de l'hémolysine.

Si l'on désire conserver la préparation, on ajoute 200 µg de streptomycine pour prévenir les contaminations ultérieures.

4.4. TITRAGE DE L'HEMOLYSINE.

Le surnageant est dilué de 2 en 2 avec du tampon ASL ;

Avec la peptone placentaire :

Pseudomonas aeruginosa	Température optimale	Pigments	Unités Hémolytiques aux différents temps		
			24 h	48 h	72 h
P1	37°	+	0	0	0
P2	37°	+	16	32	16
P3	37°	-	64	128	128
P5	37°	+	16	64	32
P6	37°	+	16	64	64
P8	37°	-	32	64	32
P9	37°	+	64	128	128
P10	37°	+	32	64	64
P11	37°	-	32	64	64
P12	37°	+	64	64	32
P13	37°	+	64	64	64

Avec le milieu tryptone :

Pseudomonas aeruginosa	Température optimale	Pigments	Unités Hémolytiques aux différents temps		
			24 h	48 h	72 h
P1	37°	-	0	0	0
P2	37°	+	0	4	2
P3	37°	-	2	4	2
P5	37°	-	0	0	0
P6	37°	-	0	2	0
P8	37°	+	2	4	2
P9	37°	+	4	8	2
P10	37°	-	2	2	2
P11	37°	-	4	8	0
P12	37°	+	1	1	2
P13	37°	-	0	2	2

- Production d'hémolysine par les différents types de Pseudomonas en fonction de la peptone (Tableau XV) -

puis on ajoute 0,5 ml d'une suspension à 2,5 p. 100 d'érythrocytes de lapin.

La lecture est faite après deux heures d'incubation à 37° au bain-marie.

Le nombre d'unités hémolytiques correspond à l'inverse de la dilution la plus grande ayant montré une hémolyse complète.

On titre de manière plus fine la dilution la plus grande correspondant à une hémolyse totale; cette dilution trouvée nous donnera l'unité hémolytique de la préparation.

4.5. RESULTATS. (*tableau XV*).

Constatons que notre préparation, outre la constance de la production de pigments, dont nous avions déjà fait état, a permis d'obtenir des titres hémolytiques très supérieurs à ceux du milieu tryptoné.

Les résultats obtenus au cours de ces études de production de toxines et enzymes nous ont donc montré que notre préparation présentait des qualités tout à fait comparables à celles des autres peptones utilisées à cette fin.

-- ooo --

C O N C L U S I O N

Nous avons étudié les possibilités de production d'une peptone bactériologique par digestion papaïnique de résidus de placentas humains provenant de la fabrication industrielle des gamma-globulines.

La détermination expérimentale des paramètres de fabrication (concentration en enzyme et en substrat, température, pH, durée de digestion) nous a montré qu'il était intéressant de travailler dans les conditions suivantes :

Décongélation et broyage des résidus placentaires, addition de deux fois leur poids d'eau, incubation 3 heures à 75° à pH = 7 en présence de 0,4 p. 100 de papaïne, puis thermocoagulation une heure à 105°, suivie d'une filtration à chaud et d'une lyophilisation immédiate.

Dans ces conditions, nous avons obtenu un rendement moyen de 75 grammes de peptone lyophilisée par litre de filtrat.

Nous avons préparé plusieurs lots de cette peptone, que nous avons étudiés comparativement à plusieurs peptones commerciales choisies pour leurs qualités nutritives.

Sur le plan chimique, notre préparation s'est révélée semblable aux autres produits commerciaux quant à sa composition, bien que particulièrement riche en certains acides aminés indispensables à la croissance bactérienne (Arginine, Lysine, Méthionine, Tryptophanne).

Sur le plan microbiologique, les études (pouvoir nutritionnel vis-à-vis des principaux germes pathogènes, dosage des facteurs de croissance, essais des pharmacopées, réalisation des principaux tests utilisés couramment pour l'identification des bactéries, production de toxines et d'enzymes bactériens) ont mis en valeur son haut pouvoir nutritif, égal et souvent plus élevé que celui des autres peptones commerciales.

En particulier, elle s'est montrée très apte aux réactions microbiologiques de l'indole, de l'acétylméthylcarbinol et de l'hydrogène sulfuré, et très favorable à la pousse de germes aérobies (citons Corynebacterium Diphteriae, Pasteurella Multocida et Hemophilus parainfluenzae) et anaérobies (particulièrement Welchia perfringens).

Elle s'est également montrée très apte à la production des hémolysines et des hyaluronidases par certaines souches de Staphylocoques, de Streptocoques et de Pneumocoques.

Si cette étude démontre la possibilité très importante de récupération de résidus placentaires pour la fabrication de peptones, elle n'a pas permis d'établir de relation entre la composition physicochimique et le pouvoir nutritif des différentes peptones.

Elle confirme donc la supériorité des tests de croissance microbiologiques sur les dosages chimiques pour l'évaluation du pouvoir nutritif de telles préparations.

VU, le Directeur de
l'U.E.R. des Sciences
Pharmaceutiques,

M. CARRAZ

Le Président de la Thèse :

VU et PERMIS d'IMPRIMER
LYON, le 29 Juin 1974

Le Président de l'Université C.BERNARD

J. BOIDIN

ICONOGRAPHIE

I/ LES PEPTONES BACTERIOLOGIQUES

Tab. I Les peptones dans les Pharmacopées p. 25

II/ TRAVAIL PERSONNEL

A) Utilisation du placenta et de la papaïne

Tab. II. Les techniques de fabrication des peptones p. 29

B) Essais de fabrication

Tab. III. Influence des différents paramètres sur la production de peptone placentaire p. 34
Graph. 1. Influence de la papaïne p. 41
Graph. 2. Influence du pH p. 43
Graph. 3. Influence de la température p. 46
Graph. 4. Influence de la durée de digestion p. 47
Graph. 5. Influence de la dilution du substrat p. 49
Schéma du fermenteur de laboratoire p. 57

C) Essais physicochimiques

Tab. IV. Dosage des protéines et des acides aminés p. 65
Tab. V. Teneur des peptones en acides aminés libres p. 67
Tab. VI. Teneur des peptones en acides aminés totaux p. 68
Tab. VII. Teneur des peptones en acides aminés libres et totaux p. 69
Graph. 6. Influence des mucopolysaccharides sur la croissance p. 75

D) Essais microbiologiques

Graph. 7. Etalonnage du biophotomètre p. 86
Graph. 8. Courbes de croissance biophotométriques p. 86

Graph. 9. Traduction des courbes de croissance en coordonnées semi-logarithmiques p. 87
Tab. IX. Influence de la dilution et de la pression osmotique p. 90
Graph. 10. Comparaison photométrique du rendement en germes p. 92
Graph. 11. Influence de la dilution sur le rendement en germes p. 93

Courbe de croissance des germes
1 et 2 : S. pneumoniae et S. faecalis p. 99
3 et 4 : N. meningitidis et N. sicca p. 101
5 et 6 : E. coli et S. typhi p. 103
7 et 8 : B. abortus et P. multocida p. 105
9 : H. parainfluenzae p. 106
10 et 11 : C. diphteriae et L. monocytogenes p. 108
12 et 13 : P. aeruginose et M. Lwoffi p. 110
14 et 15 : L. casei et L. helveticus p. 112

Tab. X. Ordre d'arrivée cumulé des peptones p. 115

Courbe de croissance de croissance des germes anaérobies
16 et 17 p.121
18 et 19 p. 124

E) Production de toxines et d'enzymes

Tab. XI. Production de staphylolysine p. 147
Tab. XII. Production de staphylohyaluronidase p. 150
Tab. XIII. Production de streptolysine O p. 159
Graph. 12. Croissance de Strepto. pyogenes A 78 en milieu A2 p. 160
Tab. XIV. Production de pneumolysine et de hyaluronidase p. 166
Tab. XV. Production d'hémolysine par les différents types de Pseudomonas p. 168

BIBLIOGRAPHIE

(1) ALOUF J. et RAYNAUD M., Action de la streptolysine O sur les membranes cellulaires,
Ann. Inst. Past., 1968, 115 (1) : 813, 115 (2) : 97.

(2) ALOUF J. et RAYNAUD M., Purification de la streptolysine O,
Compt. Rend. Acad. Sci., 1967, 264 : 2524.

(3) AVRAMEAS J., Isolement des enzymes protéolytiques de la pancréatine,
Biol. Med., 1965, 54 : 563 - 635.

(4) BADINAND A. et COTTE J., Premières recherches sur les extraits placentaires préparés selon la méthode de Filatov,
Ann. Pharm. Franc., 1949, 7 (2) : 151 - 163.

(5) BADINAND A. et MALLEIN R., Identification d'acides aminés dans les extraits tissulaires,
Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33 (9) : 1307 - 1311.

(6) BADINAND A. et MALLEIN R., Recherche des polypeptides dans les extraits tissulaires,
Conf. Soc. Pharm. Sud Loire, 8/5/1955, Bordeaux.

(7) BALIS et HYLIN, Metabolism of Streptococcus faecalis mutants,
Cancer Research, 1958, 18 : 220.

(8) BAMJI M.S. et KRISHNAMURTHI D., Fatty change in the liver of rats fed on diets containing dry human placenta,
Indian. J. Med. Res., 1969, 57 (11) : 2158 - 2165.

(9) B.B.L., Manual of products and laboratory procedures, 5° Ed., 1968.

(10) BELIN, Digestion papaïnique des viandes cuites. Application à la préparation d'un nouveau milieu de culture,
Ann. Inst. Past., 1943, 69 : 305.

(11) BENOIST D., Etude des méthodes quantitatives en microbiologie, Thèse Paris, 1948.

(12) BERGER M. et HORNSTEIN B., Die Inhalstoffen der placenta, Bibl. gynaecol. Suisse, 1961, 14 (25), 92 p.

(13) BERGMANN F.H. et LEVINE L., Fetuine : Immunochemistry and quantitative estimation in serum, Biophys. Biochem. acta 1962, 58 : 41.

(14) BERNARD J. et LAMBIN S., Introduction à l'étude des modalités d'action des substances antiseptiques, Ann. Pharm. Franc., 1955, 13 : 172.

(15) BERNARD J. et LAMBIN S., Du choix des peptones utilisables en bactériologie, Ann. Pharm. Franc., 1961, 19 (9) : 558 - 579, 19 (11) : 678 - 691.

(16) BERNARD J. et LAMBIN S., Substances bactériostatiques pour St. aureus par la méthode des courbes de croissance, Ann. Pharm. Franc., 1961, 100 : 427 - 444.

(17) BETAIL G., Analyse chimique et antigénique des extraits placentaires préparés selon la méthode de Filatov, Thèse Pharm. Clermont, 1967.

(18) BIECHELER W. et GEHM J., Vergleichende Untersuchungen zur Salmonellen - und Shigellen - Diagnostik, Zentralbl. Bakt. Abt. I. Orig., 1952, 158 (7) : 548 - 550.

(19) BONDIVENNE R., COULET M. et BETAIL G., Etude chromatographique d'extraits placentaires, Ann. Pharm. Franc., 1961, 19 : 523 - 531.

(20) BONET, MAURY et PERRAULT, Enregistrement photométrique du mode d'action des sulfamides, Ann. Inst. Past., 1945, 71 : 495 - 502.

(21) BOMPIANI A., VIGNALI M. et NANI S., Vitamin B content of maternal serum, of serum of umbilical cord and placenta, Acta vitaminol., 1963, 17 : 59 - 64.

(22) BOURLAND M. et LEVEAU H., Extracting fetal organ, GB I, 1082, 782 (CL A 61k), Sept. 1967.

(23) BOYD M.J., LOGAN M.A. et TYRELL A.A., The growth requirements of Clostridium perfringens,
J. Biol. Chem., 1948, 174 : 1013 - 1025.

(24) BRISOU J. et BABIN R., Culture des bactéries anaérobies à l'air libre en milieu viande-foie papaïné,
Ann. Inst. Past., 1950, 79 : 331 - 333.

(25) BRISOU J. et BABIN R., Culture des bactéries anaérobies en présence de succinate de soude,
Compt. Rend. Soc. Biol. Bordeaux, 1950, 144 : 1166 - 1167.

(26) BREWER C.M., Use and abuse of Staphylococcus aureus as a test organism,
J. Pub. Health, 1942, 32 : 401 - 405.

(27) BREWER C.M., Variations in phenol coefficient determination of certain desinfectants,
Ann. J. Pub. Health, 1943, 33 : 261 - 264.

(28) CARRAZ M., Essai d'homogénéisation des crachats tuberculeux par la papaïne,
Thèse Pharm. Lyon, 1947.

(29) CARRAZ M. et VIAL J., Détermination de l'antihyaluronidase streptococcique et son intérêt dans la maladie de Bouillaud,
Rev. Lyonn. Med., 1954, 3 : 675 - 681.

(30) CAMPBELL L.L. et FRANK H.A., Nutritional requirements of some putrefactive anaerobic bacteria,
J. Bact., 1956, 71 : 267.

(31) CASSAGNE A., Milieux de culture,
2° Edition, Coll. : Techniques de base, 1966.

(32) CHRISTIE D.R., The effect of different peptone bases on gas production by Clostridium sporogenes,
Med. Research. Council, Mont. Bull., 1954, 13 : 211 - 212.

(33) CIBA FOUNDATION, Chemistry and biology of mucopolysaccharides,
1958, London, Ed. J.A. Churchill.

(34) CLAVELIN C., Etude d'un milieu de culture à base de protéolysat,
Thèse Pharm. Strasbourg, 1953.

(35) COTONI L. et CHAMBRIN N., Recherche sur l'hémolysine pneumococcique,
Ann. Inst. Past., 1928, 42 : 1536 - 1572.

(36) COTTE J. et BUREAU M.N., Préparation d'un extrait placentaire selon la méthode de Filatov,
Labo. Pharma., 1959, 7 (66) : 9.

(37) COTTE J. et GATTEFOSSE, Codification et standardisation des méthodes de fabrication et de contrôle de certains extraits d'organes (placenta, embryon),
Cosmetol., 1958, 11 : 1.

(38) COULTER J.R., Production, composition and purification of staphylococcal alpha toxin,
J. Bact., 1966, 92 : 1655 - 1662.

(39) DALEN, Production of staphylococcal alpha toxin in a definited medium,
J. Gen. Microb., 1973, 6 (74) : 5360 - 5365.

(40) DARBOIS J.A., Etude d'un hydrolysat enzymatique de fibrine comme peptone bactériologique,
Thèse Pharm. Strasbourg, 1970.

(41) DERYABINA L.A. et TRACHUK M.G., A comparative biochemical evaluation of some placental preparations for parenteral feeding (Russ),
Izv. Akad. Nauk. Latv. S.S.R., 1970, 7 : 51 - 59.

(42) DERYABINA L.A. et TRACHUK M.G., Further studies concerning testing of hydrolysates made from whole organs,
Izv. Akad. Nauk. Latv. S.S.R., 1970, 7 : 69 - 73.

(43) DESBORDES J. et NINARD B., Problèmes posés par la sélection des produits azotés dégradés destinés à la préparation des milieux de culture,
Prod. Pharma., 1962, 17 : 432 - 450.

(44) DI CAPRIO J.M., RANTZ L.A. et RANDALL E., Studies on streptococcal hyaluronidase and antihyaluronidase,
Arch. Int. Med., 1952, 89 : 374 - 386.

(45) DOUVRES F.W. et TROMBA J., Influence of serum, peptones and cell cultures on development of Ascaris suum in vitro,
J. Parasitol., 1970, 56 (2) : 238 - 248.

(46) DRENTH J., JANSONIUS J.N. et KOEKOEK R., Structure of papaïn,
Nature, 1968, 218 : 929 - 932.

(47) DUCLOY J., Contribution à l'étude des peptones commerciales,
Thèse Pharm. Lille, 1936.

(48) DUPONT C., Pharmacologie des peptones,
Prod. et prob. pharm., 1962, 17 (9) : 405 - 421.

(49) DUVAL M. et GERMAN A., Recherches sur l'antihyaluronidase streptococcique,
Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41 : 1585 - 1627.

(50) FAGUET M., Enregistrement des courbes de croissance microbienne par le microbiophotomètre enregistreur,
Ann. Inst. Past., 1959, 97 : 176 - 187.

(51) FAGUET M., La croissance de Clostridium sporogenes étudiée au microbiophotomètre électronique,
Ann. Inst. Past., 1961, 100 : 594 - 600.

(52) FABER V., Streptococcal hyaluronidase : Review and turbidimetric method of determination,
Acta. Path. Microbiol. Scand., 1952, 31 : 345 - 354.

(53) FISHMAN M.M., Hyaluronidase : an annoted bibliographic (1955 - 1966),
Ed. by Technical Service Laboratories River Edge (New Jersey).

(54) FRIEDMAN M.E. et RAESSLER W.G., Growth of Listeria monocytogenes in defined media,
J. Bact., 1961, 82 : 528 - 533.

(55) FUCHS A.R. et BONDE G.J., The nutritional requirements of Clostridium perfringens,
J. Gen. Microbiol., 1957, 16 : 317 - 329.

(56) FUGIOKA R. et HILMER A.F., Nutritional requirements for germination, outgrowth, and vegetative growth of a putrefactive anaerobes in a chemically defined medium, J. Bact., 1966, 92 (5) : 1515 - 1520.

(57) FUVESSY I., BOSZORMENZI J. et VERESS A., Effect of physicochemical parameters of Streptococcus pyogenes cultures on the formation of O Streptolysin (Eng), Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1967, 14 : 335 - 343.

(58) GABY L.W., LOGAN C. et WHITAKER S., Catabolism of nitrogeneous compounds tested by various strains of bacterias, J. Gen. Microbiol., 1962, 28 : 379 - 384.

(59) GARDAIS A., PICARD J. et TARASSE C., Microdosage des glycosaminoglycanes par électrophorèse sur acétate de cellulose, J. Chromatog., 1969, 42 : 396 - 407.

(60) GAUTHIER B. et CAPPELAERE J., Sur l'essai de la papaïne, Ann. Pharm. Franc., 1957, 15 : 31 - 38.

(61) GREWAL J.S., Effect of nitrogen nutrition on growth of Atternaria tenuis, Lloydia (Cincinnati) 1955, 18 (2) : 74 - 81.

(62) GRIFFITHS D.J., Effects of peptone on the growth of heterotrophic culture of Chlorella vulgaris, Planta, 1967, 75 (2) : 161.

(63) GUVEN K.C., Identification of peptone by thin layer chromatography (Turk), Eczacilik Bul., 1968, 10 (7) : 109.

(64) HABEEB A., A study of bacteriological media : The bacto-casitone, J. Pharm. Pharmaco., 1959, 11 : 157 - 162, 376 - 382.

(65) HABEEB A., A study of bacteriological media : The proteose-peptone, J. Pharm. Pharmaco., 1960, 12 : 119 - 121.

(66) HABS I., Untersuchung über die O antigen von Pseudomonas aeruginosa,
Z. Hyg. Infekt. K., 1957, 144 : 218 - 228.

(67) HABS I. et KLEINMAIER, Untersuchungen über die O antigen von Pseudomonas aeruginosa und verklebe technik,
Zhl - Sht - Ovig, 1958, 172 (1 - 8) :54 - 65.

(68) HALBERT S.P., Stroptolysin O,
Microbiol. toxins, T. III, 1970, Ed. C. Montie-Salomer Kadig, Acad. Press. New-York.

(69) HALLANDER H.O. et LAWRELL G., Identification of penicillin stimulated staphylococcal hemolysin as alpha lysin,
Acta. path. Microbiol. Scand., 1972, 80 : 690 - 694.

(70) HERRIOTT R.M., MEYER E.M. et VOGT M., Defined medium for growth of Haemophilus influenzae,
J. Bacteriol., 1970, 101 : 513 - 516.

(71) HOLT L.B., Growth factor requirements of Haemophilus influenzae,
J. Gen. Microbiol., 1962, 27 : 317 - 321.

(72) HOOK A.E. et FABIAN F.W., Chemical and bacteriological studies on peptones,
Mich. State Coll. Exp. Sta. Techn. Bull., 1943, 5 : 185.

(73) HOOVER S.R. et KOKES E.L., Effect of pH upon proteolysis by papaïn,
J. Biol. Chem., 1947, 167 : 199 - 206.

(74) IKEDA et HIROSHI, On the growth inhibiting effects of Streptomycin and Penicillin under aerobic and anaerobic conditions,
Jap. Journ. Bact., 1954, 9 (10) : 867 - 873.

(75) ILLIEN R., Contrôle et standardisation d'extraits biogènes d'origine animale,
Thèse Pharm. Strasbourg, 1961.

(76) INOUE T., Effect of glucose and casein hydrolysate on the production of hemolysin by S. pneumoniae,
Excerpta med., 1955, 8, Sect. 4 : 367.

(77) JARRIAULT H., Alpha staphylolysine et antialphastaphylolysine,
Thèse Mèdecine Poitiers, 1968.

(78) JAVILLIER M., Produits pharmaceutiques dérivant de l'action des ferments protéolytiques,
Thèse Agreg. Pharm. Paris, 1903.

(79) KARLIN R., Le dosage microbiologique de la vitamine B12 dans le sérum sanguin,
Path. Biol., 1967, 15 (19 - 20) : 983 - 986.

(80) KHAIRAT O., An efficient general purpose culture medium for aerobes and anaerobes,
Can. J. Microbiol., 1966, 12 (2) : 323 - 331.

(81) KHESGI S., Microbiological evaluation of peptones,
J. Biochem. Microbiol. Technol. eng., 1959, 1 : 115 - 129.

(82) KIMATA M. et KADOTA H., Nutritional N-requirement of marine sulfate-reducing bacteria,
Bull. Jap. Soc. Sci. Kish, 1955, 21 (4) : 229 - 234.

(83) KLUDAS K.H., Zur qualitatsbestimmung des bakteriologischen peptons,
Arch. Exper. Vet. Med., 1959, 13 : 331 - 334.

(84) KLUDAS K.H., Uber die Bedeutung des Peptones in bakteriologischen Nahrmedien,
Arch. Exper. Veter. Med., 1967, 21 (2) : 483 - 493.

(85) KLUDAS K.H., Untersuchungen uber enzymatische Eiweisspaltprodukte bakteriologischer Nährmedien,
Arch. Exp. Veter., 1967, 21 (2) : 495 - 499.

(86) KOWALSKA D. et AUGUSTYNIAR B., Studies on the production of staphylococcal alpha toxin (Russ),
Med. Dosw. Mikrobiol., 1970, 22 (3) : 211 - 215.

(87) KRIVORUCHK R.A., Aminoacid composition of a placenta hydrolysate (Russ),
Gematol. i. Pereliv. Krovi, 1965, 79 - 82.

(88) LASSOUDIERE A., La papaïne : production, propriétés, utilisation,
Fruits, 1969, 24 (11 - 12) : 503 - 520.

(89) LATER R., QUINCY C. et BADINAND A., Contrôle de la préparation industrielle des hydrolysats protéiques,
Pdts et Prob. Pharma., 1962, 17 (6) : 261 - 262.

(90) LAVOILLE C., Action du formol sur les peptones officinales et quelques protéines,
Thèse Pharm. Lyon, 1948.

(91) LAWS G.J. et INGHAM H.R., Contrasting growth on different peptones,
J. Med. Microbiol., 1971, 4 (2) : 289 - 292.

(92) LEMBKE A. et KAUFMAN W., Paper chromatography studies on peptones,
Milchwissenschaft, 1954, 9 : 45 - 47.

(93) LIGHT A. et SMITH E.L., Digestion chrymotrypsique de la papaïne,
J. Biol. Chem., 1960, 235 : 3144 - 3151.

(94) LIV. P.U., Survey of hemolysine production among of Pseudomonas,
J. Bact., 1957, 74 : 719 - 727.

(95) LORIAN V., Antibiotiques produisant une hémolysine staphylococcique,
Presse Médicale, France, 1971, 79 (17) : 759.

(96) LOWRY O.H. et ROSEBROUGHT N.J., FARR A.L., Protein measurement with Folin phenol reagent,
J. Biol. Chem., 1951, 193 : 265 - 275.

(97) LUND E., Significance of various peptone preparations to the growth of pneumococci,
Acta. Path. Microb. Scand., 1954, 34 : 311 - 312.

(97 bis) LWOFF A. et ANDUREAU A., La nutrition carbonée de Moraxella lwoffi,
Ann. Inst. Past., 1941, 66 : 417 - 424
1940, 64 : 126 - 166.

(98) MAC DADE J.J. et SHAFFER J.G., Studies on the growth of Entomobea histolytica with peptones other than trypticase, Ann. J. Trop. Med. and Hagg., 1959, 8 (5) : 540 - 545.

(99) MANUEL Y. et JEANNIN M., Dosage et identification des mucopolysaccharides acides urinaires, Rev. Inst. Past. Lyon, 1969, 2 : 125 - 134.

(100) MARR A.G., WILSON E.H. et CLARK D.J., The maintenance requirement of Escherichia coli, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 102 : 536 - 548.

(101) MERRIFIELD R.B. et DUNN M.S., The microbiological determination of pyrimidines with lactobacilli, J. Biol. Chem., 1950, 186 : 331 - 341.

(102) MESNARD P. et DEVAUX G., Sur le dosage de la peptone dans les médicaments, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1960, 99 : 73 - 76.

(103) MESTREZAT, Formol titration des acides aminés en solution aqueuse, Bull. Soc. Chim. Biol., 1914 - 1918, 1 : 107.

(104) MEYER K., Biological signifiance of hyaluronic acid and hyaluronidase, Physiol. Rev., 1947, 27 : 335 - 359.

(105) MEYER R., Etude chimique et bactériologique des peptones, Z. Hyg. Infection., 1954, 138 : 382 - 406.

(106) MIKIO AMAHA et KIN-ICHIRO SAKAGUCHI, Effect of carbohydrates, proteins and bacterial cells in the heating media on the heat resistance of Clostridium sporogenes, J. Bact., 1954, 68 : 338 - 345.

(107) MONOD J., Recherche sur la croissance des cultures bactériennes, Thèse Sciences, Paris, 1942.

(108) MORCH E., Pneumococcal hemolysin, Acta. Patho. Micro. Scand., 1946, 23 : 555 - 575.

(109) MORSCHOINE J., Des qualités bactériologiques des diverses peptones,
Thèse Pharm. Paris, 1935.

(110) MOUSON J.G., Placenta tissue extract (Brevet),
GER 1, 173, 613 (CL A 61 k), July 1964.

(111) MURASCHI T.F. et BOLLES D., Serologic typer of Pseudomonas aeruginosa based on heat stable O antigens,
J. Inf. Dis., 1969, 116 : 84 - 88.

(112) MURATA, RYOSUKE, TAKAKO YAMADA, Studies of the influence of peptone on the production of toxin by Clostridium perfringens,
Jap. Journ. Bact., 1956, 11 : 151 - 155.

(113) MUKUBI O., Effects of nutrients on the development of the sclerotiá of Dactuliophora tarii Leakey,
Trans. Brit. Mycol. Soc., 1969, 53 (1) : 47 - 51.

(114) NAITO et RYOICHI, Placental peptone for bacterial culture,
Green Cross Corporation, 1967, U.S. 3, 434, 928, Japan
(CL 195 - 29, C 12 b).

(115) NOKAK E.K. et PERENYI T., The effect of different peptone preparations and yeart extracts on the fermentation, (Hung)
Advan. Frontiers. Plant. Sci., 1967, 18 : 97

(116) OKUMARA, Méthode de purification de la papaïne,
Bull. Soc. Chim. Japon, 1938, 13 : 534.

(117) OXOID MANUAL (THE) of culture media and ingredients, 3° ed.

(118) PAINVIN P.M., Etude de la lyse de Staphylococcus aureus par le bactériophage Twort,
Thèse Doc. Sci. Caën, 1968, CNRS N° 1366 - 1967, et CR Acad. Sci., 1968, 267 (16) : 333 - 336.

(119) PATZNALDT H.G. et FRIEDEMANN J., Die Aussagekraft chemisch-analytischer Kriterien beider Wertbemessung von peptonen,
Z. Med. Labortech, 1965, 6 (6) : 393.

(120) PHAN THAI AN, Etude d'une méthode turbidimétrique de détermination d'antipneumohyaluronidase sérique,
Thèse Pharm. Lyon, 1963.

(121) PHARMACOPEE INTERNATIONALE, 2° Ed., O.M.S., Genève 1966,
SRPI : 144.

(122) PHARMACOPEE FRANCAISE - CODEX, 6° Ed., 1939 : 536.

(123) PHARMACOPEE FRANCAISE, 8° Ed., 1968 : 787 - 788.

(124) EXTRA PHARMACOPEIAE MARTINDALE, Pharmac. Press. London,
1972, 26° Ed. : 2944.

(125) THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 18° Ed., 1970 : 1013 - 1016.

(126) PETIT M., Sur les peptones,
J. P. Ch., 1881, 5 : 529.

(127) PETUELY F., Bifidus factor,
Deuts. Mediz. Wocheschr., 1957, 82 (2) : 1957 - 1960.

(128) PLUSCHKAT H., Uber die mikrobiologische Aminosaurebertimmungin Peptonen,
Pharmazie, 1964, 19 (4) : 270 - 273.

(129) PREVOT A.R., TAFFANEL J. et RAYNAUD M., Etude d'un milieu sans viande pour la culture des anaérobies : le bouillon de placenta,
Ann. Inst. Past., 1944, 70 : 181 - 182.

(130) PREVOT A.R., TUPIN A. et KAISER P., Les bactéries anaérobies,
Ed. Dunod, Paris, 1967.

(131) PUECH A. et DURU C., Dosage du tryptophanne par colorimétrie à l'acide glyoxylique,
Ann. Pharm. Franc., 1971, 29 : 493 - 500.

(132) QUINTO G., SEBALD M. et PREVOT A.R., Etude du pouvoir pathogène et du rôle de l'hémine sur la croissance de Bistella pseudoinsolita,
Ann. Inst. Past., 1963, 105 : 455 - 459.

(133) QUINTO G., Aminoacids and requirements of several bacteroides strains,
Appl. Microbiol., 1966, 14 (6) : 1022 - 1026.

(134) RAIJCHERT M., Influence of media, temperature and ventilation on the formation of hyaluronidase by staphylococci, (Russ),
Med. Doswiadczlna Mikrobiol., 1961, 13 : 97 - 104.

(135) RAMON G., POCHON J. et AMOUREUX G., Sur la production économique des toxines microbiennes au moyen de bouillon à base de viande de cheval impropre à la consommation,
C.R. Acad. Sci., 1940, 211 : 304 - 306.

(136) RAMON G., POCHON J. et AMOUREUX G., Sur la production de toxine diphtérique et staphylococcique et des anatoxines correspondantes au moyen d'un nouveau milieu de culture,
C.R. Acad. Sci., 1941, 213 : 847 - 848.

(137) RAMON G., POCHON J. et AMOUREUX G., Production des toxines diphtériques et staphylococciques sur un nouveau milieu de culture à base de digestion papaïnique,
C.R. Soc. Biol., 1941, 135 : 1502 - 1506
1942, 136 : 329 - 331.

(138) RAMON G., POCHON J. et AMOUREUX G., Préparation de la toxine tétanique à l'aide de digestion papaïnique de viande et de foie de cheval,
C.R. Soc. Biol., 1943, 137 : 350
1943, 137 : 8 - 9.

(139) RAMON G., POCHON J. et AMOUREUX G., Le milieu de culture à base de digestion papaïnique de viande et l'obtention de ferments microbiens à partir de germes divers,
C.R. Acad. Sci., 1944, 219 : 268 - 270.

(140) RAPPORT M. et LINKER A., Hydrolysis of hyaluronic acid by pneumococcal hyaluronidase,
J. Biol. Chem., 1951, 192 : 283 - 291.

(141) RAYNAUD M., Problèmes posés par Bifidobacterium bifidus,
Ann. Pediat., 1959, 35 : 241 - 270.

(142) REDDISH G.J., BURLINGAME et ELLA, The effect of peptone on the resistance of Staphylococcus aureus,
J. Ann. Pharm. Assoc., 1938, 27 : 331 - 334.

(143) RUBI G., Valeur séméiologique du dosage des anticorps antienzymes staphylococciques et pneumococciques, Thèse Med. Lyon, 1968.

(144) RUNOVA U.F., Culture de C. perfringens en milieu synthétique, Zh. Mikrobiol. Epidem. Imm., SSSR, 1962, 33 (3) : 56 - 62.

(145) SAIFER A., GERSTENFELD S. et HARRIS A.F., Photometric microdetermination of aminoacids in biological fluids with the nihydrin reaction, Clin. Chim. Acta., 1960, 5 : 131 - 140.

(146) SCHMIDT J., Untersuchungen über Staphylokokken hyaluronidase, Zbl. Bakteriol. Parasitenz. Inf., 1966, 199 (4) : 483 - 497.

(147) SCHUHARDT V.T. et RODE L.J., The development of peptone toxicity for brucellae with aging and the correlation with the probable oxydation of cysteine, J. Bacteriol. 1950, 60 (5) : 655 - 660.

(148) SCHUHARDT V.T. et RODE L.J., An antibrucella-factor in peptones, J. Bacteriol., 1949, 57 : 1 - 8.

(149) SCHWACHBACHER H., Hyaluronidase production by staphylococci, Brit. J. Exp. Path., 1945, 26 : 124 - 129.

(150) SEKINE et YUTAKA, Value of whale peptone meat as culture media for bacteria, (Jap) Jour. Tokyo Univ. Kish., 1954, 41 (1) : 59 - 68.

(151) SHANKAR K. et BARD R.C., Effect of metallic ions on the growth, morphology and metabolism of C. perfringens, J. Bact., 1955, 69 : 436 - 448.

(152) SHOCKMAN G.P., CONOVER M.J. et KOLB J.J., Nutritional requirements of a bacterial cell wall syntheus, J. Bacteriol., 1961, 81 : 44 - 50.

(153) SHOIN S. et NISHIKAWA Y., Isolation and purification of a cofactor from commercial peptone inducing formation of Streptolysin S,

Ann. Repp. Res. Inst. Tuberc., Kanazawa Univ., 1962, 20 (2) : 81 - 89.

(154) SNELL E.E., Vitamins methods, V 1, Academic Press Inc. N.Y., 1960.

(155) SKEGGS H.R., DRISCOLL C.A. et TAYLOR H.N., Nutritional requirements of Lactobacillus bifidus and L. leichmanii, J. Bact., 1953, 65 : 733 - 738.

(156) SOHRAB H., Utilisation du placenta en microbiologie, Ann. Inst. Past., 1947, 73 : 916 - 918.

(157) SOSKA JIRI, Growth of lactobacillus in the absence of folic acid, J. Bacteriol., 1966, 91 (5) : 1841 - 1849.

(158) SNELL E.E. et STRONG F.M., Growth factor for lactic acid bacteria, Biochem. J., 1937, 31 (2) : 1789.

(159) SRIPATHY N.U., LAHIRY M.L. et SREENIVASAN A., Rate of hydrolysis of fish flesh with papaïn - Standardisation of digestion conditions for preparation of hydrolysates rich in peptones and proteoses -, Food. Technol., 1962, 16 (5) : 138 - 141.

(160) STORY P., Stimusation of hemolysis by penicillin, J. Pathol. Bacteriol., 1953, 65 : 61 - 66.

(161) STUYTERMAN L.A., Product inhibition of papaïn action, Bioch. Biophy. Acta, 1964, 85 (2) : 316 - 321.

(162) SUBBA R. et VISWESWARAM D., Loss of resistance of bacterial spores towards heat and formaldehyde when incubated in peptone and gelatin solutions, Ind. Jour. Microbio., 1962, 2 (4) : 187 - 190.

(163) TOENNIES G. et GALLART D., Growth of Streptococcus faecalis, Growth, 1949, 13 : 7 - 11.

(164) VAILLANT A., Les peptones, Paris, 1938.

(165) VERDER E. et EVANS J., A proposed antigenic schema for the identification of strains of Pseudomonas aeruginosa, J. Inf. Dis., 1961, 109 : 183 - 193.

(166) VESCHAMBRE R., Contribution à l'étude des anaérobies. Culture, détermination et toxinogenèse sur un nouveau milieu à base de protéolysat, Thèse Pharm. Strasbourg, 1952.

(167) VITAMINS, Vol. VII, 2° Ed. Acad. Press N.Y., Ed. par Gyorgy et Pearson.

(168) WAHL R. et MEYER P., Milieux de culture et méthode d'isolement pour les streptocoques et les pneumocoques, Ann. Inst. Past., 1957, 92 : 43 - 55.

(169) WEBB M., Growth of C. welchii in complex media deficient in magnesium, J. Gen. Microb., 1948, 2 : 275 - 287.

(170) WELSHINER H.J., Vitamin requirements of Listeria monocytogenes, J. Bacteriol., 1963, 85 : 1156 - 1159.

(171) WEUFFEN W., PLUSCHKAT H. et PAHLKE U., Untersuchungen uber den Einfluss von peptonen verschiedener Herkungt auf das Ergebnis des Bakteriostatest, Z. Ges. Hyg., 1967, 13 (9) : 677 - 680.

(172) WISEMANN G.M., The Beta and Delta toxins of Staphylococcus aureus, Microbiol. Toxins, 1970, 3 : 237 - 263.

(173) WILLIAMS R.P., GOTT C.L. et GREEN J.A., Studies in pigmentation of Serratia marcescens, J. Bact., 1961, 81 : 376 - 379.

(174) WILLIAMS R.P. et GOTT C.L., Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in Serratia marcescens, J. Bact., 1971, 106 : 438 - 443.

(175) WOLF P.A., A medium containing an acid casein hydrolysate for use in testing disinfectants,
J. Bact., 1945, 49 : 463 - 472.

(176) YAMAJII Y. et TAKAHASHI M., Comparison of peptones with pathogenic halophile as test organism, (Jap)
Nipp. Saiking. Zasshi., 1964, 19 (12) : 483.

(177) ZIEGLER R.J. et DAVES MOORE L., Effects of aminoacids starvation on Streptococcus faecalis,
J. Bacteriol., 1971, 105 : 190 - 199.

(178) ZISKA P., Konzentrationbestimmungen von Peptonen, und Fleischextraktlösungen,
Z. Ges. Hyg., 1966, 12 (7) : 511 - 513.

(179) ZISKA P., Untersuchungen zur molekularen Verteilung von polypeptiden in handelsublichen Kasein und Fleischpeptonen mittels Gelgiltration,
Arch. Hyg. Bakteriol., 1967, 151 (3) : 370.

(180) ZISKA P., Bestimmung des Anteils an Polypeptiden in Peptonen durch Gelchromatographie an Sephadex G 25,
Pharmazie, 1969, 24 (1) : 46
1969, 24 (7) : 391 - 395.

Association Corporative des Etudiants en Médecine de Lyon
8, avenue Rockefeller - 69373 LYON Cedex 2 - Tél. (78) 74-33-47

Association Corporative des Etudiants en Médecine de Lyon
8, avenue Rockefeller - 69373 LYON Cedex 2 - Tél. (78) 74-33-47